UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1961 — Nº 75

LES LIPIDES

DE L'OS NORMAL ET FRACTURÉ

Travail de la Clinique Chirurgicale Infantile et Orthopédie
et du Laboratoire de Biochimie de la Faculté de Médecine.

●

THÈSE

POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE
(DIPLÔME D'ÉTAT)

présentée et soutenue publiquement en Juin 1961

par

Jacques VALDIGUIÉ
Interne des Hôpitaux

MEMBRES DU JURY ...

MM.	VIRENQUE	*Président*
	DARDENNE	*Assesseurs*
	DOUSTE-BLAZY	—
	PASQUIÉ	—
	MONTASTRUC	*Suppléant*

TOULOUSE
IMPRIMERIE DES CAPITOULS
9, Rue d'Astorg

1961

LES LIPIDES

DE L'OS NORMAL ET FRACTURÉ

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546524_0044

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1961 — Nº 75

LES LIPIDES

DE L'OS NORMAL ET FRACTURÉ

Travail de la Clinique Chirurgicale Infantile et Orthopédie
et du Laboratoire de Biochimie de la Faculté de Médecine.

●

THÈSE

POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLÔME D'ÉTAT)

présentée et soutenue publiquement en Juin 196

par

Jacques VALDIGUIÉ

Interne des Hôpitaux

MEMBRES DU JURY ...

MM.	VIRENQUE	*Président*
	DARDENNE	*Assesseurs*
	DOUSTE-BLAZY	—
	PASQUIÉ	—
	MONTASTRUC	*Suppléant*

TOULOUSE
IMPRIMERIE DES CAPITOULS
9, Rue d'Astorg

1961

UNIVERSITE DE TOULOUSE

FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACI

TABLEAU DU PERSONNEL

DOYEN	M.	LAZORTHES	Professeurs honoraires	MM.	VALLOIS
ASSESSEUR	M.	DELAS			CLERMONT
Doyens Honoraires	MM.	GORSE			DUCUING
		CALVET			RIBAUT
		LEFEBVRE			NANTA
		BRUSTIER			TAPIE

SECTION MEDECINE

PROFESSEURS

Clinique Médicale	MM.	MERIEL	Accouchement et obstétricie sociale	MM.	PONTONNIER
Clinique Médicale		GADRAT	Anatomie		LAZORTHES
Clinique chirurgicale et gynécologique		FABRE (P.)	Anatomie appliquée		POULHES
Clinique chirurgicale et du Cancer		GRIMOUD	Anatomie pathologique		FABRE (J.)
Clinique chirurgicale infantile et Orthopédie		VIRENQUE	Bactériologie, Hygiène et Médecine sociale		ANDRIEU
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques		BAZEX	Chimie biologique		VALDIGUIE
Clinique des maladies de la Tuberculose et Pathologie interne		MOREL	Electro-Radiologie		MARQUES
Clinique des maladies des voies urinaires		LHEZ	Embryologie		BROUSSY
Clinique médicale infantile et Puériculture		SOREL	Histologie		BIMES
Clinique de Neurologie et Psychiatrie		RISER	Hydrologie thérapeutique et climatologie		DARNAUD
Clinique obstétricale		GUILHEM	Médecine Légale et du Travail		PLANQUES
Clinique odonto-stomatologique		CADENAT (E.)	Médecine Sociale		BOUNHOURE
Clinique ophtalmologique		CALMETTES	Parasitologie		BOUISSET
Clinique O.R.L. et de chirurgie maxillo-faciale		CALVET	Pathologie chirurgicale		DAMBRIN
Clinique traumatologique des membres		RIEUNAU	Pathologie générale et Médecine expérimentale		SENDRAIL
			Physico-Chimie		AUVERGNAT
			Physiologie		SOULA
			Physiologie appliquée et Pharmacologie		BAISSET
			Physique biologique et médicale		BUGNARD
			Propédeutique médicale		GERAUD
			Thérapeutique		DARDENNE

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL ET PROFESSEURS SANS CHAIRE

Anatomie générale et comparée	M.	COULOUMA	Bactériologie	Mme	ENJALBERT
Pathologie médicale	MM.	LAPORTE (J.)	Physiologie	MM.	LAPORTE (Y.)
Chimie médicale	M.	DOUSTE-BLAZY	Physique médicale		BRU

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Histologie	MM.	PLANEL	Anatomie Pathologique	MM.	BOUISSOU
Physiologie		MONTASTRUC	Parasitologie		RUFFIE (J.)

AGREGES

Pathologie médicale	MM.	MONNIER	Pathologie chirurgicale (suite)		PASQUIE
		RIBAUT			SOUQUET
		DELAUDE	Médecine légale		GREZES-RUEFFI
		CALAZEL	Odontostomatologie		CADENAT (H.)
Pathologie chirurgicale		ENJALBERT	Pédiatrie et Puériculture		BARDIER
		FICAT	Rhumatologie		RUFFIE (R.)

AGRÉGÉS LIBRES

Anatomie	MM.	THOMAS	Oto-Rhino-Laryngologie	MM.	CLAUX
Ophtalmologie		DEODATI	Pathologie chirurgicale		DIEULAFE

SECTION PHARMACIE

PROFESSEURS

Chimie analytique, Toxicologie et Hygiène industrielle	MM.	BOURBON	Histoire Naturelle	MM.	DELAS
Pharmacie chimique		CAUJOLLE	Matière Médicale		VINCENT
Botanique et Cryptogamie	Mme	DULUCQ-MATHOU	Chimie pharmaceutique		BLANC
			Pharmacie galénique		STANISLAS

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL ET PROFESSEURS SANS CHAIRE

Pharmacie	M.	COUTURIER	Sciences Naturelles	Mlle	MEYNIER
				M.	ROUX

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Microbiologie	M.	BREUILLAUD	Sciences Physiques	M.	PITET

PERSONNEL ADMINISTRATIF

Secrétaire Principal	M.	ROCHE	Secrétaire	Mme	LAFFONT

La Faculté déclare n'être pas responsable des opinions émises par les candidats
(Délibération en date du 12 mai 1891)

Commis	M.	BLIGAND	Employée de Bureau	Mlle	BAZANGETTE

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Ce travail est dédié :

A LA MEMOIRE DE MON GRAND-PERE

Le Professeur A. VALDIGUIE

A MON PERE

Le Professeur P. VALDIGUIE

En témoignage de ma profonde affection et de mon immense admiration pour sa probité scientifique et son inlassable énergie.

A MA MERE

A MA FEMME

A MON FILS ET A MA FILLE

A MES FRERES ET A MES SŒURS

A MES GRANDS-PARENTS

A MES BEAUX-PARENTS

A TOUS LES MIENS

En gage d'amour et d'affection.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur VIRENQUE

Professeur de Clinique chirurgicale infantile et Orthopédie
Chirurgien des Hôpitaux
Chevalier de la Légion d'honneur

A NOTRE JURY DE THESE

MONSIEUR LE PROFESSEUR DARDENNE

Professeur de Thérapeutique
Médecin des Hôpitaux

MONSIEUR LE PROFESSEUR DOUSTE-BLAZY

Professeur de Chimie biologique à la Faculté

MONSIEUR LE PROFESSEUR PASQUIE

Professeur agrégé de Pathologie chirurgicale
Chirurgien des Hôpitaux

MONSIEUR LE PROFESSEUR MONTASTRUC

Maître de Conférences agrégé de Physiologie

Avant-Propos

En terminant nos études médicales et notre Internat, il nous est très agréable de présenter un juste tribut de reconnaissance aux Maîtres qui nous ont formé et dirigé et qui nous font aujourd'hui l'honneur de constituer notre jury de thèse.

M. le Professeur VIRENQUE, *à l'Ecole duquel nous sommes fiers d'appartenir, a bien voulu nous faire confiance en nous acceptant comme élève et en nous laissant réaliser une thèse dont le sujet n'avait dès l'abord qu'un contact lointain avec la Chirurgie Infantile et l'Orthopédie. Nous lui devons une grande partie de notre formation clinique et chirurgicale à laquelle son enseignement clair et pratique, sa documentation, son sens clinique ont donné une base solide, efficace et utile. Nous sommes heureux avant de soutenir cette thèse, de remercier notre Maître de la confiance qu'il nous témoigne et de l'assurer de notre respectueux attachement et de notre dévouement.*

M. le Professeur DARDENNE *a bien voulu reporter sur nous l'amitié qui, depuis de longues années, l'unit à notre Père. Il nous a aidé de ses conseils éclairés et de sa sage expérience, à maintes reprises, avant et après notre Internat. Nous sommes heureux et fier d'avoir eu le don de sa bienveillante amitié. Nous lui adressons l'assurance de notre respectueuse et reconnaissante affection.*

M. le Professeur DOUSTE-BLAZY *est, après notre Père, celui auquel nous devons notre formation scientifique. Nous connaissons depuis qu'il est le collaborateur de notre Père, sa droiture, la rectitude de ses idées et de son jugement, son ardeur au travail et sa gentillesse. Il a bien voulu, en accord avec notre Père, nous donner le sujet de ce travail, le diriger, nous initier aux techniques qu'il avait créées et nous faire bénéficier de sa grande expérience et de sa compétence de spécialiste des Lipides. Nous lui adressons avec notre bien vive gratitude, l'hommage de notre reconnaissante et très profonde affection.*

M. le Professeur PASQUIÉ *a été pour nous le maître bienveillant qui sait profiter de sa jeunesse et d'une faible différence d'âge pour conduire avec douceur et bonhomie, mais avec fermeté et rigueur, ses collaborateurs et ses élèves. Il nous a formé avec notre Maître commun, aux disciplines de la chirurgie infantile. Il a été souvent pour nous un conseiller précieux. Nous lui disons notre gratitude et notre respectueuse amitié.*

M. le Professeur MONTASTRUC *a été notre Chef de Conférences et il nous a appris les rudiments de la clinique chirurgicale et de la physiologie. Nous sommes heureux de l'assurer de notre fidèle et respectueuse amitié en le remerciant de venir apporter la compétence d'un Physiologiste dans notre Jury de thèse.*

Nous n'aurons garde d'oublier nos Maîtres de la Faculté et des Hôpitaux.

M. le Doyen LAZORTHES, *dont nous avons été l'Aide d'Anatomie et qui nous a toujours manifesté sa bienveillance ; nous conservons fidèlement le souvenir de son enseignement si limpide et si clair. Nous lui sommes reconnaissant de nous avoir fait comprendre la nécessité des connaissances anatomiques en Chirurgie,*

M. le Professeur GRIMOUD *dont nous avons été l'interne et qui, au cours d'un stage très fécond, nous a ouvert des horizons chirurgicaux attachants,*

M. le Professeur RIEUNAU *qui, lors du stage plein d'intérêt que nous avons effectué chez lui, nous a fait découvrir la spécialité de la traumatologie et de la chirurgie des membres. Notre sujet de thèse témoigne du souvenir que nous avons gardé de son enseignement.*

A nos chefs de conférences,

A tous ceux qui nous ont apporté leur aide pour la réalisation de ce travail et en particulier à Mlle Yvette ESTÉVENEL, *Assistante de Chimie biologique à la Faculté et surtout à* Mlle Yvette MÉRIC *qui a réalisé pour nous un très grand nombre de dosages,*

A M. COURRECH, *dont nous avons utilisé les talents de dessinateur,*

A M. Fernand PONS, *aide impeccable et dévoué de nos travaux d'expérimentation,*

Nous adressons l'assurance de notre reconnaissance et nos bien vifs remerciements.

A nos camarades d'internat, lorsque nous allons quitter l'atmosphère si attachante de l'Internat,

A nos camarades de la Clinique chirurgicale infantile,

Et à ceux du Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté,

Nous adressons, au moment de franchir cette étape qu'est la soutenance de thèse, l'assurance de notre bonne amitié.

Introduction

Les données classiques sur la constitution de l'os font une place très minime aux lipides, surtout lorsqu'elles envisagent le tissu osseux compact lui-même et non l'os complet dont la moelle est riche en glycérides.

Il nous a paru intéressant d'étudier les lipides de l'os pour plusieurs raisons.

Nos connaissances sur les composés organiques et sur leur rôle dans le protoplasme des cellules, amènent à juger les lipides indispensables dans tout métabolisme. Le tissu osseux contient des cellules dont les lipides et surtout les lipides complexes ne peuvent être passés sous silence (Lipoprotéines, double couche lipidique et protéique des mitochondries et des membranes cellulaires.)

Nous avons donc tâché, dans le travail que nous présentons :

1) d'étudier les données classiques sur la composition, la formation et le métabolisme de l'os et d'envisager, à propos de certains chapitres, le rôle éventuel des lipides.

2) de rechercher une modification des lipides et peut-être leur participation au métabolisme pathologique de l'os fracturé pendant sa réparation.

Connaissant par notre expérience chirurgicale les inconnues qui gênent dans certaines circonstances la consolidation des fractures, nous avons voulu envisager un éventuel facteur lipidique du problème.

Notre travail a rencontré des difficultés majeures de bibliographie et de technique. Nous avons dû souvent émettre des hypothèses pour l'interprétation de nos résultats. Certaines, seules, ont pu être vérifiées.

Nous pensons cependant avoir fait œuvre utile en apportant une contribution à une question injustement délaissée. A côté du métabolisme minéral, du métabolisme protéique et glucoprotéidique de l'os, une place non négligeable doit être faite au métabolisme lipidique.

Nous espérons que nos recherches ultérieures et celles d'autres auteurs pourront faire utilement progresser le problème que nous avons abordé.

Plan

PREMIERE PARTIE. — **L'OS NORMAL**

I. **ANATOMIE ET HISTOLOGIE.**

A) **Cellules.**
B) **Substance intercellulaire.**
C) **Disposition des éléments.**

II. **BIOCHIMIE.**

A) **Constituants minéraux.**
B) **Constituants organiques.**
I. *Collagène de l'os.*
II. *Substance fondamentale.*
III. *Lipides.*
IV. *Equipement enzymatique des cellules.*

III. **DEVELOPPEMENT ET CROISSANCE DU TISSU OSSEUX.**

A) **Anatomie et histologie.**
B) **Biochimie de l'ossification.**

IV. **METABOLISME OSSEUX.**

A) **Facteurs propres.**
B) **Facteurs généraux ou exogènes.**
I. *Facteurs alimentaires.*
II. — *vitaminiques.*
III. — *hormonaux.*

V. **L'OS FRACTURE.**

A) **Histologie.**
B) **Aspect biochimique.**
I. *Minéralisation du cal.*
II. *Rôle de la trame protéique.*

VI. **LES LIPIDES DE L'OS.**

A) **Os normal.**
I. *Os compact,*
II. *Moelle osseuse.*
B) **Os pathologique.**
C) **Os fracturé.**

DEUXIEME PARTIE. — **RECHERCHES PERSONNELLES**

I. **MATERIEL ET TECHNIQUE.**

A) **Expérimentation physiologique.**

Rat.
Chien.

B) **Expérimentation chimique.**

Préparation des extraits lipidiques.

Fractionnement de l'extrait lipidique.

a) Chromatographie sur papier
b) Séparation des phospholipides
c) Fractionnement des phospholipides
d) Chromatographie sur papier imprégné

Méthodes de dosage.

a) Dosages chimiques
b) Mesure de la radioactivité
c) Autoradiogrammes.

II. **RESULTATS.**

A) **Les lipides de l'os normal.**

Lipides totaux.
Fractions lipidiques : phospholipides.
cholestérol.

B) **Les lipides de l'os fracturé.**

I. *Lipides totaux.*
II. *Phospholipides et stérides.*
Variations avec le temps.
Variations dans les diverses parties de l'os.
III. *Etude des chromatogrammes.*
IV. *Etude de l'incorporation du phosphore* 32.
V. *Autoradiogrammes.*

C) **Discussion des résultats.**

III. **CONCLUSIONS.**

PREMIÈRE PARTIE

L'Os normal

PREMIERE PARTIE

L'Os normal

Les anciennes conceptions classiques sur la structure et la biologie du squelette ont été profondément modifiées par les travaux de Leriche et Policard (133) et les nombreuses recherches suscitées par ceux-ci. L'os est un véritable tissu.

Bien que son étude soit rendue difficile par l'hétérogénéité qu'il présente et par la difficulté de séparer le tissu osseux et le tissu conjonctivo-vasculaire qui lui est intimement lié, la plus grande partie des problèmes posés par la structure et le métabolisme de l'os ont été résolus.

La structure de la substance osseuse a été définie comme suit par Policard et Roche (163) : « il s'agit d'un constituant histologique particulier, essentiellement formé par une matière protéique plus ou moins fibrillaire, imprégnée de composés phospho-calcaires et présentant, de ce fait, une dureté caractéristique ».

Cette définition sera complétée par l'indication de l'origine de l'os : origine conjonctive ;

et par la précision d'une dualité osseuse : substance fondamentale fibrillaire et cellules.

Nous rappellerons rapidement les notions histologiques et chimiques que nous possédons sur le tissu osseux.

Nous envisagerons le problème métabolique dans le chapitre Biochimie et nous verrons qu'un certain nombre de points demande encore une solution.

I. — ANATOMIE ET HISTOLOGIE

Comme tout tissu vivant, l'os est constitué :

— de cellules spécialisées et de leur production ;
— de substance intercellulaire.

Les cellules permanentes sont appelées ostéocytes.

La production des ostéocytes est la fibrille du collagène.

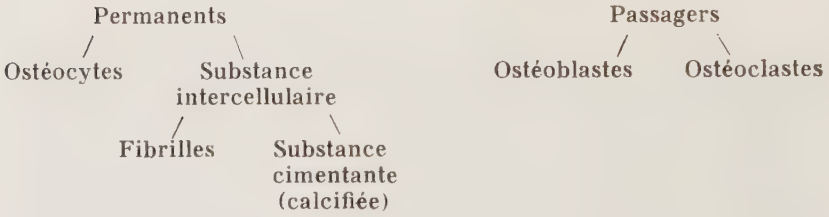
Deux autres types de cellules ont été observés pendant les stades actifs de la destruction ou de la formation de l'os, et peuvent, pour cette raison, être qualifiés d'éléments passagers du tissu osseux, distincts de ses éléments permanents.

Les cellules qui sont actives dans la formation de l'os sont appelées ostéoblastes, tandis que celles qui causent la résorption de l'os sont les ostéoclastes.

La substance intercellulaire est composée de fibrilles et d'une substance fondamentale calcifiée « cimentante ».

Weinmann (214) décrit ainsi la structure histologique du tissu osseux, schématisée dans le tableau ci-dessous :

ELEMENTS DU TISSU OSSEUX



A) **Les cellules**

1° Ostéocytes.

Les cellules de l'os arrivé à maturité ont un aspect caractéristique :

Le corps de la cellule ressemble un peu à un noyau de prune et se prolonge par de nombreux processus ramifiés dans toutes les directions, un grand nombre de ceux-ci fusionnant avec les filaments semblables des cellules voisines. Ces prolongements leur donnent un aspect étoilé.

Ainsi les ostéocytes forment un syncytium.

Le cytoplasme de ces cellules est granuleux et légèrement basophile. Il peut contenir des gouttelettes de lipides qui indiquent son activité métabolique.

Des mitochondries et un appareil de Golgi net sont également visibles.

Dans les préparations à l'hématoxyline-éosine, le noyau ovalaire est coloré en noir, à cause de la structure grossière de la substance chromaffine.

Les mitoses ne s'observent jamais chez les ostéocytes.

Emmurés dans la substance osseuse à l'édification de laquelle ils ont participé en tant qu'ostéoblastes, ils sont situés soit entre les lamelles de la substance osseuse, soit dans leur épaisseur.

Il faut noter que la forme particulière des ostéocytes et de la cavité qui les contient entraînera de grandes différences de forme suivant le plan de section.

2° Ostéoblastes.

Il n'y a pas de doute que les ostéoblastes jouent un rôle dans la formation et la calcification de la substance intercellulaire du tissu osseux (Urist) (209).

Leur forme varie considérablement et il existe une corrélation entre la forme et la taille des ostéoblastes et le degré de formation de l'os.

Quand le processus de formation est actif, les ostéoblastes ont une forme cuboïdale, irrégulière, de 15 à 25 microns de diamètre.

Leur noyau sphérique est situé excentriquement sur la paroi opposée à celle qui est au contact de l'os.

Leur cytoplasme est uni par de nombreux prolongements aux ostéoblastes voisins. Dans le cytoplasme basophile, on distingue un appareil de Golgi et un chondriome. Une vacuole au voisinage du noyau contient la sphère attractive et les centrioles.

Donc, dans ce cytoplasme, on trouve de nombreux organites : vacuoles, grains de ségrégation, chondriome formé de mitochondries et de chondriocontes assez flexueux ; ils sont en rapport avec une activité sécrétoire certaine.

Dubreuil (59) a trouvé de fines vacuoles à contenu lipidique colorable par l'hématoxyline ferrique et Hill (105) a caractérisé dans les ostéoblastes en activité des granules soudanophiles.

La sécrétion de ces cellules préside à l'édification de l'osséine ou substance préosseuse.

Elle a été mise en cause aussi pour expliquer la formation du collagène, celle des glucoprotéines et celle de la phosphatase alcaline.

Stetten (202) a montré en nourrissant des rats avec des régimes expérimentaux que l'hydroxyproline du collagène n'est pas d'origine alimentaire, mais provient de l'oxydation de la proline déjà liée dans des chaînes peptidiques.

Ces résultats ont été confirmés par S. Fitton-Jackson et Smith (111) étudiant au moyen de L-Proline marquée par du Carbone 14 la formation des fibrilles de collagène par les ostéoblastes en culture.

Leur travail a montré aussi cependant que les diverses parties du cytoplasme de ces cellules contiennent d'autres acides aminés que ceux qui sont nécessaires à la synthèse du collagène.

Pour leur origine et leur devenir, nous mentionnerons l'opinion de Leriche (133) qui les fait dériver des fibroblastes et celle de Dubreuil (59) ; les ostéocytes proviennent des cellules conjonctives jeunes du type cellules mobiles rondes émigrées des vaisseaux, et pouvant donner, soit des ostéoblastes, soit des ostéoclastes suivant le sens de leur évolution.

3° Ostéoclastes.

On leur a attribué de nombreuses origines :

—fibroblastes, cellules réticulo-endothéliales, ostéoblastes.

Il semble qu'ils soient le produit d'une différenciation des cellules conjonctives jeunes, d'abord mononucléées, puis acquérant progressivement un grand nombre de noyaux.

Adultes, les ostéoclastes sont des cellules géantes multinucléaires de forme et de taille variables. Leur cytoplasme est bourré de mitochondries. Il est fréquemment irrégulier dans ses contours avec de gros prolongements en massue, de longueur variée et contenant souvent des vacuoles ; ces prolongements ne s'anastomosent ni entre eux, ni avec des éléments voisins. Il a une réaction acidophile qui est un important caractère de diagnostic.

Quand ces ostéoclastes sont au contact de la substance calcifiée de l'os, leur protoplasme a parfois un aspect strié. Le nombre de leurs noyaux varie d'une cellule à l'autre.Habituellement de 12 à 20, il peut s'élever jusqu'à 100. Les noyaux sont pauvres en chromatine et en général contiennent un ou deux nucléoles.

Les ostéoclastes ne sécrètent pas de produits figurés mais des enzymes lytiques chargés de détruire la substance intercellulaire.

Leur action se manifeste non seulement sur cette substance intercellulaire, mais sur tous les composés protéiques mis à leur contact : cartilage, corps étranger, fil de suture par exemple.

Les sels de calcium libérés par la destruction de la substance protéique de l'os seront en même temps solubilisés par un autre mécanisme (hormones parathyroïdiennes).

Si la destruction est rapide, les sels minéraux sont absorbés et solubilisés par les macrophages.

Les caractères et les localisations différentes des trois types de cellules osseuses suggèrent que chacune intervient dans une partie spécifique du métabolisme l'os :

— ostéoblastes : dans la phase de construction ;

— ostéocytes : dans la phase d'équilibre métabolique ;

— ostéoclastes : dans le catabolisme.

Nous retrouverons ces trois parties sur le plan biochimique.

Il nous reste à signaler d'autres cellules, les fibroblastes que Sognnaes (200) décrit à côté des ostéocytes. Adjacentes aux ostéoblastes, elles joueraient un rôle capital dans le développement de la charpente fibreuse, par analogie avec les fibroblastes de la pulpe qui jouent ce rôle dans la formation de la dentine (Korff) (119).

B) La substance intercellulaire

La substance intercellulaire contenant les ostéocytes dans les lacunes et leurs prolongements dans des canalicules apparaît presque homogène sur les coupes de tissu décalcifié et coloré par hématoxyline et éosine.

Par des méthodes particulières telles que l'imprégnation argentique, on révèle de fines fibrilles de collagène qui sont arrangées en faisceaux variés de 3 à 5 microns d'épaisseur.

L'invisibilité des fibrilles dans les préparations ordinaires est due au fait que celles-ci ont pratiquement le même indice de réfraction que la substance fondamentale.

La substance cimentante, sur la nature de laquelle nous reviendrons, est constituée de protéines et de glycoprotéines qui ont une aptitude à fixer les sels minéraux, phosphate de calcium en particulier.

C) Disposition des éléments

L'os parvenu à maturité est lamellé : une lamelle est une mince couche de substance intercellulaire, de 4 à 12 microns d'épaisseur ; les ostéocytes se disposent à la surface et dans l'épaisseur de cette lamelle. Certains de leurs filaments perforent la lamelle pour communiquer avec ceux des cellules situées dans une lamelle adjacente. Les fibrilles de lamelles voisines sont disposées suivant des directions différentes. On voit dès lors sur les coupes, soit leur longueur, soit leur section. C'est la diversité des directions des fibrilles qui donne à l'os son aspect lamellé (Weinmann et Sicher) (214).

Un tel arrangement de fibrilles accroît la résistance de l'os aux forces mécaniques, en particulier de cisaillement (Engfeldt) (67).

La forme et la disposition des lamelles sont très différentes dans les deux types d'os que l'on distingue macroscopiquement, os spongieux et os compact.

1) *L'os spongieux.*

Il consiste en barres, plaques ou tubes d'os de directions et de longueurs variées se rejoignant dans les 3 dimensions.

Les espaces entre les trabécules communiquent d'un bout à l'autre de l'os spongieux.

2) *L'os compact.*

Dans l'os compact, la plupart des lamelles sont arrangées en systèmes cylindriques. Chaque système consiste en un nombre varié de lamelles concentriques groupées autour d'un canal axial cylindrique, étroit, régulier, qui contient les vaisseaux sanguins et de fines fibres et qui communique par des canalicules avec d'autres canaux.

Ce système de lamelles concentriques et de canaux est appelé « système de Havers ».

Les ostéocytes de ce système sont rangés en longues files parallèles à son grand axe. Les canalicules des lamelles les plus centrales s'ouvrent dans un canal où leurs filaments sont au contact des cellules du canal médullaire de Havers ; la nutrition des cellules et de la substance intercellulaire est assurée par le contact avec les vaisseaux du canal.

Les lamelles d'un système de Havers au nombre de 5 à 20 sont aisément reconnaissables à cause de la différence de direction de leurs fibrilles, longitudinales dans une lamelle, circulaires dans l'autre et ainsi de suite.

Pour conclure cette étude très brève de la nature histologique de l'os, nous rappellerons la division morphologique qu'a proposé Petersen (158) en 4 ordres de structures :

Ordres	Structure des composants
1er ordre	Os compact et spongieux.
2e ordre	Système de Havers et lamelles.
3e ordre	Lacunes, ostéocytes et fibres de tissu fibreux.
4e ordre	Substance amorphe et sels organiques.

II. — BIOCHIMIE

L'os est le tissu le plus minéralisé de l'organisme et le moins riche en eau.

Il est constitué de deux fractions distinctes : une matrice protéique et des sels minéraux, les « sels de l'os », fixés sur elle.

Sa composition chimique est sensiblement constante pour chaque type d'os, le degré de minéralisation croissant progressivement avec l'âge.

Les os longs définitifs de l'adulte renferment en moyenne 49 % d'eau, 16 % de lipides, 12 % de protéines et 23 % de sels minéraux (Polonovski) (165).

L'os sec comprend 70 % de sels inorganiques et 30 % de matériel organique.

A) Les Constituants Minéraux

Les premiers dosages des constituants minéraux avaient été faits sur les cendres. Puis Gabriel proposa sa technique (79) : l'os est traité par la potasse dans le glycérol à 290° C ; les matières organiques sont détruites et il reste, apparemment inchangée, la substance minérale.

L'analyse spectrographique a plus récemment apporté de nouveaux documents.

On considère encore comme type la moyenne de nombreuses analyses centésimales faites suivant cette méthode de Gabriel. La moyenne de ces dosages rapportée par Aron (7) était :

CaO	52,0 %	K_2O	0,2 %
MgO	1,2 »	Cl	0,1 »
P_2O_5	40,3 »	Fl	0,1 »
Na_2O	1,1 »	CO_2	5,0 »

Exprimés suivant l'usage actuel ces résultats deviendraient :

Ca	37,14 %	K	0,16 %
Mg	0,70 »	Cl	0,10 »
P	17,59 »	F	0,10 »
Na	0,81 »	CO_3	6,81 »

Ils diffèrent peu des résultats postérieurs, de Hammet (97) et de Morgulis (147) par exemple.

	Calcium	Magnésium	Phosphore	CO_2
Chien ..	35,7	0,46	15,8	5,6
Bœuf ..	36,1	0,74	16,4	4,6
Lapin ..	36,3	0,53	16,0	5,7
Poule ..	37,2	0,51	16,4	5,5
Rat	37,5	0,85	18,5	»

Dans ces tableaux, le calcium, le phosphore et l'anion carbonique ont une prépondérance très importante.

Mais la méthode de Gabriel détruit les acides organiques en les transformant en carbonates. Aux composés initialement trouvés, il faut dès lors ajouter des sels mixtes, sels de calcium d'acides organiques, produits de la respiration des ostéoblastes qui s'accumulent sous forme de lactate et citrate de calcium. On trouve également du phophate de magnésium et enfin des traces de chlorures et de fluorures alcalins et alcalino-terreux.

Cartier (35) donne la composition suivante de l'os séché à 100° et dégraissé :

	Cendres	70,2 %
	Azote	4,43 »
Anions	Ac. phosphorique (en phosphore)	12,6 »
	Ac. carbonique (en CO_2)	3,9 »
	Ac. citrique	1,2 »
	Ac. lactique	0,12 »
Cations	Sodium	3,43 »
	Calcium	27,5 »
	Magnésium	0,43 »
Rapport	Ca/P	2,18 »
Rapport	P/N	3,67 »

Les sels de l'os sont qualitativement bien connus.

La question qui se pose est de savoir sous quelle forme ces constituants sont groupés.

On retrouve deux combinaisons majeures : du phosphate de calcium (sous forme tricalcique comme l'indique le rapport Ca/P voisin de 1,94) et du carbonate de calcium.

Dans le tableau suivant, nous citons les chiffres indiqués par Cartier (39) :

Phosphate tricalcique α	74,4	%
Carbonate de calcium	10,3	»
Citrate de calcium	2,0	»
Lactate de calcium	0,19	»
Phosphate de magnésium	0,92	»
Carbonate de magnésium	1,02	»
Phosphate disodique	2,44	»
PO_4^{---} / Ca^{++} } protéiques	< 8,7	»

Un point important sur lequel on a longtemps discuté est représenté par les rapports entre le phosphate tricalcique et le carbonate de calcium.

Certains auteurs apportent des arguments en faveur de l'indépendance chimique relative de la fraction carbonate et de la fraction phosphate. D'autres attribuent à la substance minérale de l'os une structure moléculaire complexe du type des apatites, extrêmement stables.

L'étude des spectres de diffraction aux rayons X a d'abord conduit à admettre l'existence d'un mélange d'apatites microcristallines du type $3(PO_4)_2Ca_3$, $Ca\,X_2$ où X représenterait un anion.

Dans une mise au point récente, Dallemagne (50) conclut que la substance minérale de l'os est constituée de phosphate tricalcique α $3(PO_4)_2Ca_3$, $2\,OH_2$ ayant adsorbé une faible quantité de carbonate calcique, de carbonate magnésien et de carbonate sodique et potassique, ces derniers se présentant peut-être sous la forme d'un carbonate complexe.

La réunion de ces molécules de phosphate tricalcique hydraté constitue le cristal osseux qui se présente sous l'aspect d'une tablette hexagonale de $400 \times 250 \times 50$ Angstrœms (Robinson et Watson) (175). La diffraction aux rayons X permet de caractériser des unités plus petites de $9{,}4 \times 9{,}4 \times 6{,}9$ Angstrœms.

Ces conclusions ont été confirmées par les études de solubilité de Cartier (38) soulignant également l'absence de combinaison chimique entre le phosphate et le carbonate de l'os.

La composition minérale des os se modifie au cours de la vie, d'abord au cours de l'ossification du cartilage pendant la croissance, puis dans l'os Haversien.

La croissance terminée, l'os s'enrichit en carbonate et le rapport Ca/P s'élève régulièrement.

Même chez l'adulte, malgré la constance apparente de la composition des cendres, les variations ne sont pas négligeables. En utilisant du phosphate marqué par du phosphore radioactif P_{32}, on a constaté en une semaine une fixation osseuse de 30 % de la dose injectée ; puis, peu à peu, ce phosphore radioactif disparaît lui-même de l'os auquel il s'était intégré. Ce remplacement du phosphore ordinaire par son isotope dans le sein même de l'os serait un processus d'échange physico-chimique, les mécanismes enzymatiques qui président à l'ossification n'intervenant pas (Polonovski) (165).

B) Les Constituants Organiques

La partie organique de l'os représente 24 à 26 % du poids de l'os brut, ce chiffre étant calculé par la détermination de la teneur en azote, qui serait de 4,7 % de l'os sec (Baker) (13).

Ces constituants organiques sont de deux types (nous ne parlons plus des acides organiques déjà mentionnés) :

1) les fibres de collagène formées d'agrégats de fibrilles élémentaires et constituant un réseau, un véritable squelette fibreux ;

2) la substance fondamentale dans laquelle ces fibres sont noyées.

Nous envisagerons successivement l'étude du collagène, puis celle des constituants de la substance fondamentale.

I. Le collagène de l'os.

Le collagène est le constituant majeur de la matrice de l'os dont il représente 90 à 96 % (Rogers) (187). Ceci est mis en évidence dans le tableau n° 1 où cet auteur a donné les variations des taux du collagène avec l'âge.

Tableau N° I

Collagène du fémur humain à différents âges

Age des sujets (en années)	Mg de N par gramme de poudre d'os sec dégraissé		N Collagène / N total %
	Total	Collagène	
2,5	48,3	46,4	96,68
7	49,7	47,7	95,97
10	49,3	44,2	89,65
15	47,8	44,3	92,67
27	47,3	45,2	95,56
41	46,5	43,6	93,76
65	46,7	41,3	88,43
			M 93,24

Le collagène est la protéine de tout le tissu conjonctif de l'organisme. Il représente 25 à 35 % des protéines totales du corps ; 40 % de ce collagène est situé dans les os (Lightfoot et Coolidge) (140).

La morphologie de cette scléroprotéine a été étudiée et est bien connue grâce au microscope électronique et à son spectre de diffraction aux Rayons X.

Le collagène est une protéine fibreuse.

Ce caractère fibreux qui avait été reconnu par l'examen au microscope ordinaire, a été confirmé et précisé par les deux méthodes ci-dessus.

Les constituants du Collagène qu'elles ont permis d'identifier sont :

— les fibres ;
— les fibrilles ;
— les protofibrilles ;
— les macromolécules de tropocollagène.

Fibres. — Elles sont visibles macroscopiquement et au microscope ordinaire, et ont un diamètre de 100 à 1 000 millimicrons.

Le microscope électronique a permis de reconnaître :

1° que la fibre du collagène est formée par l'union de constituants plus petits, les fibrilles ;

2° que ces fibrilles sont disposées bout à bout, donnant aux fibres une périodicité longitudinale de 640 A (Schmidt, Hall et Jakus) (192).

Fibrilles. — La périodicité observée dans les fibres fixe la longueur des fibrilles à 640 A. Leur largeur est de plusieurs centaines à quelques milliers d'Angstrœm (Schmidt) (191). Elles sont disposées dans les fibres en bandes régulières présentant au microscope électronique une striation due à l'alternance de zones denses et de zones moins denses, plus perméables aux électrons (Wolpers) (224), bandes et interbandes de Bear (18). Nous verrons l'interprétation structurale donnée à ces différences.

Protofibrilles. — Ce sont les unités capables de s'accoler latéralement pour former les fibrilles. Elles doivent donc avoir une dimension transversale très faible. Ces protofibrilles sont considérées comme étant des molécules de tropocollagène Gross, Highberger et Schmidt (90), Gross (89).

Tropocollagène. — C'est une macromolécule ayant une longueur de 2 400 A à 3 000 A et une largeur de 10 à 15 A (suivant l'hydratation) qui a pu être directement observée au microscope électronique par la technique de Hall (94).

Cette molécule est formée de 3 chaînes peptidiques enroulées en hélice (Crick et Rich) (49) et séparées par un intervalle de 5 A environ. La stabilité de la molécule est due à des liaisons hydrogène entre les acides aminés des trois chaînes.

Le poids moléculaire du tropocollagène serait de 340 000 à 360 000, Boedtker et Doty (23).

La seule difficulté de cette conception de structure moléculaire est que la molécule de tropocollagène de 2 400 A au moins donne aux fibrilles qu'elle constitue une périodicité de 640 A. Le problème est encore non résolu.

L'existence de bandes claires et sombres au microscope électronique tient à la disposition des chaînes latérales sur les 3 chaînes peptidiques hélicoïdales.

Dans les bandes, les chaînes latérales sont assez longues, formées d'acides aminés basiques ou acides et disposées dans un certain désordre. Les interbandes, au contraire, ont des chaînes latérales assez courtes, alanine, sérine, thréonine, valine, auxquelles leur interaction donne une disposition régulière Bear (17).

Les macromolécules de collagène sont elles-mêmes constituées de molécules élémentaires dont le spectre de diffraction aux rayons X est celui d'un ellipsoïde de révolution ayant environ 14 à 18 A de diamètre et une longueur beaucoup plus importante, mais encore mal définie. Le poids moléculaire de cette molécule serait de 70 000. Dépourvue de ramifications, elle est constituée par 3 chaînes polypeptidiques enroulées en hélice (Crick et Rich) (49).

Cette structure est stabilisée par les mucopolysaccharides sulfatés ou non, qui forment le « ciment » interfibrillaire, en contractant essentiellement des liaisons hydrogène et en moindre quantité des liaisons ioniques avec les protéines.

Le collagène de l'os diffère de celui du reste du corps en ce qu'il est calcifiable (Strates) (204). Nous envisagerons cette calcification à propos de l'ossification. Chaque molécule de collagène contiendrait environ 600 acides aminés.

La composition du collagène en acides aminés a été étudiée par de nombreux auteurs et en particulier par Bear (18) et Eastoe (65).

Nous donnons, dans le tableau n° II, les résultats obtenus par Eastoe (65) :

TABLEAU N° II

Composition en acides aminés du collagène de l'os

	Collagène de l'os compact en g. d'acide aminé/100 g. de protéines	
	Fémur de bœuf	Fémur humain
Alanine	10,5	10,9
Glycine	25,3	25,8
Valine	2,65	2,97
Leucine	3,93	3,60
Isoleucine	1,73	1,88
Proline	14,7	15,3
Phénylalanine	2,88	2,49
Tyrosine	0,56	0,86
Tryptophane	0,0	0,0
Sérine	4,24	4,06
Thréonine	2,52	2,35
Cystine	0,0	0,0
Méthionine	0,80	0,84
Arginine	9,2	8,8
Histidine	0,96	0,96
Lysine	4,11	4,40
Acide aspartique	7,1	6,4
Acide glutamique	11,9	11,4
Hydroxyproline	14,1	14,1
Hydroxylysine	1,12	0,62
Glucosamine	0,0	0,0
Galactosamine	0,0	0,0
TOTAL	118,3	118,0
N TOTAL	18,26	18,45
N AMIDÉ	0,63	0,56

Si le collagène est essentiellement formé d'acides aminés, il contient cependant 0,1 % de lipides (BORNES) (27) tandis qu'il ne contient pas d'ose aminé (glucosamine ou galactosamine).

L'intégrité du collagène est nécessaire à l'ossification. En effet, sur le plan clinique, la déficience de la formation de la matrice protéique est à la base de la plupart des cas d'ostéoporose. Sur le plan expérimental, on a constaté que la déficience alimentaire en certains acides aminés provoque des perturbations osseuses et dentaires.

Le collagène contient une quantité non négligeable de lysine. Par ordre de concentrations décroissantes, cet acide aminé se place en 8e position sur les 20 acides aminés trouvés par EASTOE (65) dans le fémur humain. OSBORNE et MENDEL (156) constatant une perte de poids assez importante chez de jeunes rats nourris avec de la zéine de blé comme seule source de protéines, ont mis en cause la déficience en lysine.

Des symptômes plus précis ont été décrits par Harris (98) et puis par Bavetta (16) : pour ces auteurs, il s'agit de la diminution de la calcification osseuse sur un collagène anormal pauvre en lysine.

II. La substance fondamentale.

Les fibrilles collagènes groupées en fibres sont réparties dans une substance fondamentale non structurée au moins à la limite de résolution du microscope électronique.

La substance fondamentale ressemble à celle des autres tissus conjonctifs. Elle est constituée d'une scléroprotéine : l'osséine, et d'un complexe mucoprotéique : l'ostéomucoïde. Elle contient en outre des substances en transit entre le plasma sanguin et les cellules osseuses.

A) *Osséine.*

C'est une scléroprotéine insoluble dans l'eau, les acides et les alcalis, riche en glycocolle et en hydroxyproline, pauvre en tyrosine, en tryptophane et acides aminés soufrés. Traitée par l'eau bouillante, elle se transforme en gélatine. Elle est un collagène non différencié en fibres.

B) *Glucoprotéines.*

Elles forment la plus grande partie de cette substance fondamentale. Ce sont des polysaccharides polymères d'hexosamine et d'acide glycuronique, combinés avec des protéines, Rogers (186).

Ces glucoprotéines se rapprochent par leur groupe prosthétique de l'acide chondroïtine-sulfurique du cartilage dont elles dériveraient.

Elles ont été isolées tout d'abord dans la matrice de la dentine et de l'émail par la méthode de Hotchkiss (107). Appliquant cette technique à l'os humain, Levine (137) a montré leur présence dans les ostéoblastes (sous forme de granules cytoplasmiques) et dans la substance fondamentale.

Par l'acide périodique et le réactif de Schiff, Rogers (185) a isolé les mucopolysaccharides osseux. Cette fraction mucopolysaccharidique représente 0,4 % de l'os.

Heller-Steinberg (103) a démontré la présence des granulations Schiff-positives dans les cellules d'os métaphysaire chez le rat et a associé leur présence à la formation d'os jeune.

Eastoe (66) étudiant les constituants organiques des os compacts de mammifères, a précisé la composition de ces complexes mucopolysaccharides-protéines par extraction à la chaux. Il obtient un complexe représentant 0,24 % de l'os sec, et contenant 70 % de protéines ; 2/5 du restant étant des amino-sucres, 3/5 de l'acide glycuronique, du galactose et du mannose. Il a déterminé quantitativement les acides aminés et les hexosamines. La composition en acides aminés de ces protéines est différente de celle du collagène, et assez semblable à celle du sérum sanguin.

Nous reproduisons cette teneur en acides aminés dans le tableau N° III.

TABLEAU N° III

Composition en acides aminés et en hexosamines des complexes mucopolysaccharides-protéines de l'os compact

	en g /100 g de matériel sec débarrassé des cendres
Alanine	3,70
Glycine	2,65
Valine	4,50
Leucine	7,27
Isoleucine	3,65
Proline	4,24
Phénylalanine	2,86
Tyrosine	1,98
Sérine	3,61
Thréonine	4,13
Cystine	1,13
Méthionine	0,84
Arginine	3,87
Histidine	2,65
Lysine	4,26
Acide aspartique	9,66
Acide glutamique	11,67
Hydroxyproline	0
Hydroxylysine	0
Glucosamine	1,23
Galactosamine	7,67
Méthionine	0,25
TOTAL	81,82

Il faut noter qu'EASTOE (66) n'a trouvé dans le fémur de bœuf ni lipides, ni glucides autres que ces mucopolysaccharides.

Ces deux types de constituants, scléroprotéines et glucoprotéines, sont unis probablement par des liaisons ioniques et se trouvent également combinés au collagène des fibres.

C) *Autres protéines.*

EASTOE (66) a mis en évidence des protéines par leur résistance à l'eau chaude. Cette fraction représente 1,02 % du poids de l'os sec. Par hydrolyse et chromatographie, il a étudié leur composition en acides aminés qui est différente de celles du collagène et de l'élastine. Elles ont, en particulier, une haute teneur en tyrosine. Leur composition en acides aminés paraît très semblable à celle rapportée pour le tissu réticulé.

HUTTON et NUCKOLLS (109) ont caractérisé la présence de peptides par la ninhydrine.

Hamilton (96) indique qu'une proportion considérable des protéines de la substance osseuse est facilement soluble dans l'eau. Cette protéine de l'os est « l'osséoalbumine », décrite il y a cinquante ans par Hawk et Gies (101). Elle contient 2 à 8 % de l'azote total de l'os.

Notons enfin que la substance fondamentale de l'os, comme celle du tissu conjonctif, doit contenir une quantité non négligeable de protéines plasmatiques.

D) *Glycogène.*

Les travaux antérieurs sur la présence du glycogène dans l'os et sur son rôle dans l'ostéogénèse ont été rapportés par Follis et Berthrong (75), qui ont discuté la signification possible du glycogène dans la calcification. Il interviendrait dans le mécanisme du dépôt du phosphate.

Ils ont montré que le glycogène augmente dans le cytoplasme des cellules du cartilage parvenu à maturité, au cours de la calcification endochondrale. Une fois la minéralisation commencée, on ne trouve plus de glycogène dans les cellules du cartilage adjacent, ou on n'en décèle que des traces.

Ramalingaswami et ses collaborateurs (169), dans une étude histochimique de la calcification de cartilage tibial de rats rachitiques, attribuent le défaut de calcification du cartilage à la perturbation du métabolisme du glycogène : l'intégrité de ce métabolisme étant nécessaire à la formation de la matrice et à la précipitation des sels de l'os.

Schajowicz (190) a montré que la nécessité et le comportement du glycogène sont identiques dans le cal des fractures en évolution.

E) *Acide citrique.*

Enfin l'os contient 70 % de l'acide citrique total de l'organisme (Dickens) (53). Cet acide, dont le sel calcique est soluble, doit jouer un rôle important dans le métabolisme osseux, tant pour l'ossification que pour la mobilisation calcique à partir du squelette.

III. Lipides.

On trouve également des lipides, glycérides et phospholipides. Mais ceux-ci ont été jusqu'ici très peu étudiés. Ils constituent le but de notre étude ; nous les envisagerons dans un chapitre particulier.

IV. Equipement enzymatique des cellules.

Pour étudier l'élaboration, la nature et la calcification de la matrice organique et des tissus minéralisés, on a recherché par des réactions histochimiques, les activités enzymatiques que possèdent les cellules osseuses.

Follis et Berthrong (75) ont passé en revue l'histochimie du cartilage et de la formation osseuse endochondrale. C'est en effet au niveau du cartilage que ces processus enzymatiques possèdent une grande importance pour la croissance et la pathologie des os longs (Wilkins) (217).

1° *Phosphatase alcaline.*

C'est Robison (176) qui, le premier, découvrit un enzyme dans l'os, une phosphatase, capable d'hydrolyser les esters phosphoriques et de libérer des ions PO_4——— utilisables pour la calcification. Fell et Robison (71) démontrant la présence de cette phosphatase alcaline dans le cartilage hypertrophique d'os embryonnaire, concluent que la phosphatase est synthétisée par les cellules cartilagineuses en voie d'hypertrophie et les ostéoblastes.

Elle a été ensuite mise en évidence dans les cellules ostéogéniques par Lorch (141) et Greep (88) qui ont apporté des modifications à la technique de Gomori (86).

Bevelander et Johnson (22) appliquant la technique de Lorch à l'étude de la calcification de l'os intermembraneux d'embryon de porc, ont observé que la phosphatase alcaline pouvait être mise en évidence dans les cellules ostéogéniques avant la calcification de l'os et que la réaction enzymatique se retrouvait, à un degré moindre, dans la matrice jeune calcifiable.

Pour Bradfield (32), l'activité phosphatasique se situe à une étape différente de la formation de l'os ; elle paraît être en rapport avec l'élaboration des protéines fibreuses.

Majno et Rouiller (142), par la méthode de Lorch, ont montré que la réaction enzymatique était présente non seulement dans les ostéoblastes mais aussi dans les ostéoclastes.

Sur cette base, ils ont suggéré l'hypothèse que l'enzyme participe non seulement à la formation mais aussi à la résorption de l'os. Dans la première phase, la phosphatase serait le vecteur de l'hydrolyse et du dépôt de l'anion PO_4———, dans la seconde phase, elle serait au contraire le vecteur de l'estérification et du retrait de ce PO_4———.

De ces diverses observations histochimiques, il ressort que la phosphatase est liée à tout le cycle métabolique de l'os : formation de la matrice, calcification et résorption.

Mais cette phosphatase alcaline qui se rencontre également dans d'autres tissus que le cartilage en voie d'ossification, ne représente pas le facteur exclusif de la calcification, Robison (176).

2° *Phosphorylase.*

C'est Glock (85) qui apporte la preuve de l'existence de « ce second mécanisme » de Robison. Le glycogène est utilisé grâce à une phosphorylase qui fonctionne comme celle du muscle, en brisant la chaîne polyglucopyranosique constitutive du glycogène et en formant du glucose-1-phosphate. Ce polyglucoprocessus a été mis en évidence par Gutman et Gutman (93).

3° *Autres Enzymes.*

L'étude histochimique des autres enzymes pouvant intervenir dans l'ossification, a été plus limitée que celle de la phosphatase alcaline et de la phosphorylase.

Mæjno et Rouiller (142) suggèrent sans être très affirmatifs, la présence de phosphatase acide.

Follis et Berthrong (75) ont montré, malgré des méthodes qui ne leur donnent pas encore une satisfaction complète, la présence de déhydrase succinique et de déhydrase citrique dans diverses zones du cartilage en relation avec la formation osseuse et la calcification.

Ceci a été confirmé par Nachlas et ses collaborateurs (149).

Ils ont également montré la présence de cytochrome-oxydase dans le noyau des ostéoblastes adjacents à des spicules d'os jeune.

Pincus (162) a rapporté la présence d'oxydase succinique.

Tout récemment un système ATP-phosphatasique a été caractérisé par Picard et Cartier (160) dans le cartilage d'embryon de mouton et de rat normal.

Cet enzyme doit donc être un constituant de l'os au moins durant la période d'ossification.

Enzymes protéolytiques.

Le caractère « calcaffine » de la trame protéique de l'os, que ne possède pas son précurseur conjonctif, apparaît par intervention d'un système protéolytique (catheptase, aminopolypeptidase, dipeptidase) identifié par Cartier (36), Polonovski et Cartier (166).

L'action de ces enzymes libèrerait sur les chaînes peptidiques des groupements fonctionnels capables de fixer les ions Ca^{++} et PO_4^{---} et de créer la « calcaffinité ».

III. — DEVELOPPEMENT ET CROISSANCE DU TISSU OSSEUX

Le problème que nous envisageons devait considérer l'os non seulement dans son état normal de tissu constitué, mais encore dans sa croissance et sa formation d'une part, et dans son métabolisme de tissu vivant d'autre part.

Comme pour la structure de l'os normal, nous considèrerons :

A) Le point de vue anatomique et histologique ;

B) Le point de vue biochimique.

L'os, en constant métabolisme, se forme et se détruit continuellement aussi bien pendant la période de croissance que chez l'adulte.

A) Anatomie et histologie

Les termes de formation osseuse endochondrale et membraneuse ou intramembraneuse sont mal interprétés si ils laissent supposer

deux types d'ostéogénèse. Ces termes se réfèrent au développement macroscopique des os en tant qu'organes du squelette.

L'ostéogénèse, formation du tissu osseux, survient toujours et partout de la même manière.

Il semble justifié de diviser cette ostéogénèse en trois phases.

Dans la première, les ostéoblastes produisent une substance intercellulaire organique qui sera réorganisée dans la deuxième phase, tandis que la calcification surviendra dans la troisième.

Première phase. — Le premier signe de la formation de l'os est l'apparition d'une substance intercellulaire homogène autour de chaque cellule du mésenchyme embryonnaire ou en surface du cartilage.

Les fibrilles des fibres présentes au moment du démarrage de l'ostéogénèse semblent disparaître (dépolymérisation). Les molécules de collagène des fibrilles et les glycoprotéines polymérisées forment une substance homogène, ressemblant à la substance hyaline. Cette substance peut être appelée tissu ostéoide primaire.

Seconde phase. — Elle conduit à la formation de la substance intercellulaire calcifiable, fibrillée : le tissu ostéoide secondaire.

Les changements survenant dans cette deuxième phase peuvent être représentés par la reconstitution des molécules de collagène dans les fibrilles osseuses, celles-ci ayant une direction entièrement différente de celle qu'avaient les fibres du tissu conjonctif.

Cette polymérisation du collagène, aboutissant à la formation de chaînes s'accompagne probablement d'une dépolymérisation des glycoprotéines (Gersch) (81). Argument en faveur de ceci : le tissu ostéoide contient plus d'eau que la substance osseuse formée (Robinson) (174).

Troisième phase. — Durant ce processus, les parois latérales de ces chaînes peuvent être exposées à la combinaison avec les sels minéraux. Cette calcification n'est pas une simple précipitation. Elle s'accompagne de modifications de la substance organique. Elle dépend de l'activité enzymatique des ostéoblastes (Thomas) (205).

Cet os formé dans les premiers stades de l'ossification est différent de l'os définitif. Les différences résident tant dans les ostéocytes que dans la substance intercellulaire. Les ostéocytes sont nombreux, leur forme et leur disposition irrégulières ; ils possèdent peu de prolongements. Les faisceaux de fibres sont épais et irrégulièrement arrangés.

Petit à petit chez l'embryon et au cours des premières années de la vie, cet os jeune sera remplacé par de l'os adulte lamellé.

Pour terminer cette étude histologique de l'os, signalons que Weinmann (214) donne la classification suivante du développement de l'os en tant qu'organe.

Abandonnant la distinction entre développement endochondral ou membraneux, il préfère la classification en 3 points et il distingue trois types d'os :

1) Ceux qui prennent la place d'un modèle squelettique cartilagineux temporaire (os du squelette axial et des membres) ; nous ne décrirons pas le cartilage de conjugaison et ses cinq couches, hyaline, sériée, hypertrophique, dégénérée, conjonctivo-vasculaire Lichtwitz (138).

2) Ceux qui n'ont pas été préformés dans le cartilage et se sont développés dans le tissu conjonctif (os frontal, pariétal).

3) Enfin le maxillaire inférieur et peut-être la clavicule sont des os membraneux dans lesquels du cartilage se développe secondairement.

Cette classification lui permet une meilleure compréhension des phénomènes normaux de la croissance et une classification propre des maladies particulières du squelette.

B) **Biochimie de l'ossification**

La biochimie de la formation osseuse comporte deux phases que l'on peut schématiquement distinguer, mais qui sont intriquées et non successives.

1° Formation de phosphate tricalcique ;

2° Fixation du sel de l'os sur la matière protéique.

1° *Formation du phosphate tricalcique.*

Les éléments ioniques du plasma Ca^{++} et PO_4H^{--} qui sont en équilibre dans le milieu intérieur $(PO_4H^{--}) \times (Ca^{++}) = K$ pourront laisser précipiter du phosphate tricalcique si la concentration de l'un d'eux augmente.

La conception de Robison (176) attribue la précipitation à l'augmentation des ions phosphates sous l'influence d'une phosphatase alcaline hydrolysant les esters phosphoriques du milieu.

Mais la teneur du plasma en esters phosphoriques (0,2 à 0,5 mg par litre) n'est pas suffisante pour expliquer l'intensité et la vitesse de l'ossification.

Une autre source d'ion PO_4H^{--} est l'hydrolyse des esters phosphoriques des oses formés à partir du glycogène (Gutman) (93) par voie anaérobie dans le cartilage sérié. Ces hexose-phosphates cèdent leur radical phosphoryle à l'acide adénylique pour former de l'ATP. Celui-ci se scinde en AMP et pyrophosphate qui précipite à l'état de pyrophosphate de Ca et est ensuite hydrolysé à l'état d'orthophosphate par une pyrophosphatase (Picard et Cartier) (160).

2° *La fixation du phosphate tricalcique sur la matière protéique calcaffine.*

Elle met en cause :

a) D'abord l'affinité de la protéine pour les sels calciques. Cette affinité naît de remaniements de la protéine sous l'influence de protéases d'origine médullaire ;

b) En second lieu la liaison du phosphate tricalcique aux chaînes peptidiques de la matière protéique.

Ces liaisons sont encore mal connues. Elles vont amener les cristaux du « sel de l'os » à se déposer en s'orientant par rapport aux chaînes polypeptidiques ; l'union entre les constituants minéraux et organiques de l'os reste indéterminée. Diverses constatations basées sur la microscopie électronique et les études de diffraction aux rayons X, permettent de penser que l'axe optique des microcristaux de phosphate tricalcique est parallèle à l'axe des chaînes polypeptidiques de la trame organique. La distance qui sépare deux acides aminés voisins correspond à la longueur du grand axe de phosphate tricalcique (Engstrom) (68).

Trois cristallites de phosphate tricalcique couvrent la période de la fibre de collagène : 640 A.

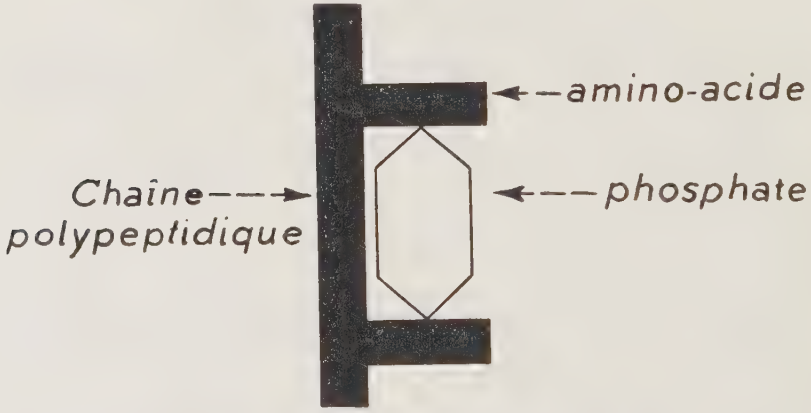


Figure n° 1. — Le cristal osseux (Courtois) (48).

IV. — LE METABOLISME OSSEUX

La formation de l'os et le maintien de sa double polarité statique et dynamique : constitution du squelette et ravitaillement de l'organisme en ions PO_4— — — et Ca+ +, en un mot, le métabolisme du tissu osseux, dépendent : de facteurs propres,
de facteurs généraux ou exogènes.

A) Facteurs propres.

Un métabolisme tissulaire met en cause dans sa phase anabolisante et catabolisante tous ses constituants :

cellulaires,
structuraux,
enzymatiques.

Le tissu osseux ne fait pas exception. Tous ses constituants dont nous avons donné la liste vont participer à son métabolisme.

Le schéma simplifié du mécanisme de l'ossification que nous avons décrit illustre en partie la construction osseuse et l'anabolisme de l'os.

Une seconde phase est la destruction de l'os, la mise en circulation de ses ions PO_4H^{--} et Ca^{++} et le catabolisme de ses protéines.

Nous verrons qu'elle dépend particulièrement de l'hormone parathyroïdienne.

B) Facteurs généraux ou exogènes

Les facteurs exogènes à l'os sont :

— alimentaires,
— vitaminiques,
— hormonaux.

Ils nous intéressent particulièrement car ils peuvent :

1) intervenir sur les lipides osseux ;

2) agir par leur intermédiaire.

I. Facteurs alimentaires.

Les facteurs alimentaires nécessaires à la construction et au maintien en équilibre du tissu osseux sont de trois sortes :

— facteurs minéraux : calcium - phosphore ;
— facteurs organiques : protéines ;
— facteurs vitaminiques : nous les envisagerons dans un paragraphe spécial.

A) *Facteurs minéraux :* calcium et phosphore.

Le calcium et le phosphore sont indispensables dans la ration quotidienne de l'homme à tous les âges de la vie. Les besoins journaliers sont de l'ordre de 0,8 à 1 gramme pour le calcium, de 1,2 gramme pour le phosphore. Ils sont aussi élevés pendant les premières années de la vie malgré la différence pondérale. L'enfant et surtout le nourrisson ont un besoin calcique, rapporté au kilogramme de poids, supérieur à celui de l'adulte. La femme enceinte doit recevoir 1,50 à 2 grammes de calcium chaque jour.

Les quantités de calcium et de phosphore nécessaires à l'organisme doivent être dans un rapport donné. Le rapport optimum Ca/P est pour l'homme aux environs de 1, variant de 0,6 à 2 suivant l'âge.

Les besoins calciques dépendent aussi des autres facteurs alimentaires, de la vitamine D et de l'état endocrinien du sujet.

Les déficiences phosphocalciques conduisent à l'ostéomalacie. La minéralisation de l'os est fonction de son ravitaillement par le milieu interstitiel en Ca^{++} et PO_4^{---}.

La précipitation du phosphate tricalcique par enrichissement local en ions PO_4 - - - (mécanisme phosphatasique) est possible parce que les concentrations en calcium et en orthophosphates de la lymphe interstitielle arrivent à être proches de la saturation. Chez l'ostéomalacique, du fait, soit d'une carence alimentaire en phosphore ou en calcium, soit d'un trouble de l'absorption ou de l'excrétion, les concentrations en Ca+ + et PO_4— — — sont inférieures à la normale : cet état de sous-saturation du milieu rend inefficace l'enrichissement phosphatique dû à la phosphatase.

Nous ne savons pas quel rapport peut exister entre le métabolisme phosphocalcique et le métabolisme lipidique de l'os, et en particulier quel pourrait être le rôle des phospholipases du type C ou D dans la libération d'ions PO_4— — — à partir des phospholipides.

B) *Facteurs organiques.*

1) Les protéines.

Un apport alimentaire de protéines suffisant est une des conditions majeures, mais non la seule, dont peut dépendre la structure normale de la trame protéique de l'os et son aptitude à fixer le calcium.

Les troubles de la calcification osseuse que nous avons signalés chez des animaux carencés en lysine (Rohdenburg) (188) illustrent cette participation protéique à la structure de l'os.

2) Autres facteurs.

Wolbach et Hegstedt (233) ont étudié les effets de la carence en choline sur les cartilages épiphysaires du poussin. Le signe majeur de cette déficience est un élargissement, une déformation et une incapacité fonctionnelle des articulations tibiotarsiennes et tarso-métatarsiennes. Ces lésions sont dues à une déficience de maturité des cellules du cartilage, à la présence en excès d'une matrice atypique dans la zone de croissance, et d'une matrice hypertrophique avec réduction des mitoses dans la zone de prolifération.

L'étude des ostéoporoses a bien montré la participation protéique à certains troubles du métabolisme osseux. Dans ces ostéoporoses l'apport et l'absorption du calcium sont normaux, la fixation seule au niveau de l'os est troublée par altération de la trame protéique. Les troubles métaboliques qui aboutissent à l'ostéoporose se révèlent très complexes, car ils mettent en jeu, non seulement les facteurs généraux qui règlent la synthèse des protéines tissulaires, mais encore ceux dont l'intervention ne se manifeste qu'au niveau de l'os et qui transforment l'ébauche de protéines indifférenciées en une matrice capable de fixer le phosphore et le calcium.

Comme toute synthèse protéique, la synthèse de la substance préosseuse et de la trame protéique du tissu osseux nécessite :

1) un apport minimum en acides aminés, qualitatif et quantitatif ;

2) l'intervention d'un agent cellulaire (Cartier) (37) : la participation des ostéoblastes est indispensable et nous savons que

les constituants nucléotidiques et phospholipidiques de ces cellules ont une part importante dans leur activité ;

3) des facteurs hormonaux que nous verrons plus loin.

II. Facteurs vitaminiques.

L'état actuel de nos connaissances met en cause plusieurs vitamines dans le métabolisme osseux :

3 vitamines liposolubles : les vitamines A, D et E ;

1 vitamine hydrosoluble : la vitamine C,

et accessoirement le complexe vitaminique B : B_2, PP, B_6, Acide pantothénique.

A) *Vitamine A.*

B.-V. Euler (70) a établi la présence de β-carotène dans la moelle osseuse et Leach (130) l'a signalé dans le fémur du bœuf. Bien que la carence en vitamine A ne donne pas de perturbation dans la structure de l'os constitué, Wolbach et Bessey (222) ont seulement signalé son rôle sur l'émail des dents ; sa participation à la croissance est nécessaire, qu'elle agisse directement ou indirectement sur le squelette (Wolbach) (220-221).

En effet, l'hypovitaminose A réalisée chez le jeune chien a permis à Mellamby (144) de caractériser, outre une action sur les nerfs crâniens, une action propre, de mécanisme non précisé, sur les ostéoblastes et les ostéoclastes.

Cet auteur observe divers types de retard de croissance osseuse présentant des interférences avec les modèles de croissance que donnent l'inanition ou la carence en autres vitamines. Le retard de la croissance du squelette peut survenir en dehors de l'atteinte des parties molles ou du système nerveux, ce qui entraîne des compressions du cerveau et de la moelle épinière (199).

L'hypervitaminose difficile à réaliser en dehors de la vitamine D a été étudiée par Barnicot (14) plaçant un fragment d'acétate d'axérophtol sur la face endocranienne de jeunes souris. Il observa une destruction osseuse localisée au contact de la vitamine A et il pense que celle-ci provoque la différenciation d'ostéoclastes.

Cette action sur les cellules osseuses d'une vitamine liposoluble nous amène encore à penser à l'action des lipides protoplasmiques de ces cellules.

B) *Vitamine D.*

Qu'il s'agisse de D_3 ou de D_2, D_4 et D_5, nous savons par la carence en vitamine D (carence expérimentale ou rachitisme et ostéomalacie) (152), par l'hypervitaminose D et ses calcifications tissulaires (92) que les vitamines D favorisent l'absorption intestinale phospho-calcique et dès lors l'ossification et le métabolisme osseux. Elles tiennent sous leur dépendance l'excrétion urinaire du phosphore qu'elles limitent sans doute par action sur les glandes parathyroïdes (4) (77).

La vitamine D supprime les effets défavorables d'un rapport Ca/P alimentaire anormal.

Certains auteurs se sont demandé si l'action de la vitamine D sur la calcification ne pourrait pas être directe. Pour Nicolaysen et Jansen (153), elle influencerait directement la structure de la matrice de l'os, en déclenchant le développement cellulaire et la calcification de la matrice.

Reed et Reed (170) se basant sur la diffraction aux rayons X de l'os normal et rachitique des rats, indiquent différentes structures dues à la désorientation du motif cristallin. Ils attribuent ce phénomène à une action catalytique périphérique de la vitamine D.

Zetterstrœm (225) pense que l'on peut accorder une fonction enzymatique à la vitamine D.

Mais on ne peut encore que formuler des hypothèses sur le mécanisme de l'action vitaminique D et sur les relations éventuelles de celle-ci avec le métabolisme lipidique.

C) *Vitamine E.*

Pour terminer l'étude de l'action des vitamines liposolubles sur le métabolisme de l'os, il faut parler du rôle possible de la vitamine E.

Casuccio (43) note que les fractures chez des jeunes rats déficients en vitamine E sont exposées à des retards de consolidation, ce qui ne survient pas chez des rats recevant des doses adéquates de vitamine E.

Shute (195) rapporte deux cas de « fragilité » osseuse chez des enfants qui ont ensuite bénéficié de l'administration de vitamine E.

D) *Vitamine hydrosoluble. L'acide ascorbique.*

La vitamine C est indispensable au développement et au métabolisme de l'os.

Les troubles osseux du scorbut sont connus depuis longtemps, en particulier l'incapacité de la synthèse des protéines fibreuses (collagène) par les ostéoblastes (Follis) (74).

L'acide ascorbique est nécessaire à la formation et à l'intégrité de la trame protéique qui conditionne l'ossification et le métabolisme de l'os.

La constitution de la trame protéique osseuse demande une synthèse protéique, l'acide ascorbique intervient dans celle-ci, il permet à l'os de « tirer parti des matériaux qui lui sont fournis » Cartier (39).

La transformation de la trame protéique en substance calcaffine, apte à fixer le calcium dépend aussi de la vitamine C.

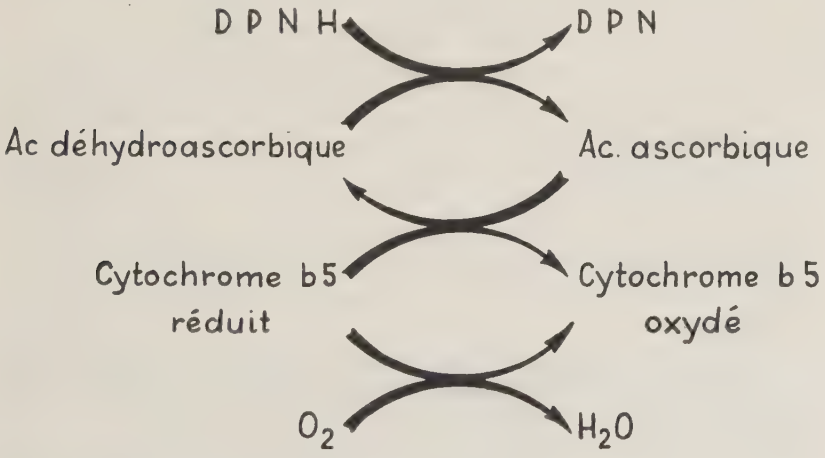
Roche (180) a montré que l'acide ascorbique est nécessaire au fonctionnement propre des ostéoblastes. Suivant avec Martin-Poggi (180) l'évolution du taux de la vitamine C au cours de la consolidation des fractures, il conclut que la rapidité de celle-ci est proportionnelle à la teneur du cal en vitamine C.

Cette action stimulante sur la formation du cal a été retrouvée par Imperati (110) et par Giancrasso (83).

Bourne (31) a confirmé ces données en montrant que la consolidation osseuse se produit chez le cobaye scorbutique si on ajoute de l'acide ascorbique au régime alimentaire de l'animal.

Après plusieurs hypothèses, on sait maintenant que le rôle de l'acide ascorbique est de maintenir le taux de la cytochrome-oxydase des ostéoblastes (Follis) (76).

Kersten et ses collaborateurs (116), Krisch et Staudinger (123) ont précisé ce fait à la suite de recherches portant sur les microsomes de surrénales de porc ; ils pensent que l'acide ascorbique fait partie d'une chaîne respiratoire insensible aux cyanures dans laquelle le système acide ascorbique - acide déhydroascorbique servirait de transporteur d'électrons entre le DPNH et le cytrochrome b-5.



Un autre point de l'action sur le collagène serait la participation de l'acide ascorbique à la formation et à l'intégration dans le collagène d'une hydroxyproline active (Robertson) (173).

Mitoma et Smith (146) par contre, pensent qu'il s'agit simplement de la participation de l'acide ascorbique à une maturation des fibroblastes du collagène.

E) *Le complexe vitaminique B.*

Ce complexe vitaminique a été expérimenté par Baïsset et ses collaborateurs (9) avec une préparation contenant les vitamines B_1, B_2, PP, B_6 et acide pantothénique.

Ils observent que l'injection de l'ensemble de ces vitamines à des rats porteurs de fractures expérimentales du tibia et du péroné, provoque la formation de cals plus résistants à la traction que ceux des animaux témoins.

Ces cals sont constitués de travées osseuses massives, fortement calcaffines.

La vitamine B_1 étant inefficace dans les mêmes conditions expérimentales, ne peut être responsable des effets du complexe vitaminique B.

III. Facteurs hormonaux.

Tout le système endocrinien nécessaire à l'équilibre de l'organisme agit directement ou indirectement sur le tissu osseux.

Les glandes endocrines interviennent dans l'ossification grâce à leur triple action (Baïsset, Douste-Blazy, Montastruc, et Planel) (12) :

— tissulaire sur le cartilage de conjugaison ;

— métabolique sur les mutations phospho-calciques et azotées ;

— hormonale sur les autres glandes endocrines.

Cinq glandes ont une action plus importante (Simpson, Arling et Evans) (198) :

— l'hypophyse,

— les glandes génitales,

— la cortico-surrénale,

— la glande thyroïde,

— les glandes parathyroïdes.

A) *L'hypophyse.*

L'hypophyse antérieure exerce une action très perceptible sur l'os en voie de développement par l'hormone de croissance que sécrètent ses cellules éosinophiles.

Cette hormone règle essentiellement la prolifération cellulaire sans intervenir sur le métabolisme minéral (216). Ce sont les cellules du cartilage sérié qui subissent l'action stimulante de l'hormone somatotrope (Lichtwitz et coll.) (138).

Cette stimulation est très facile à mettre en évidence sur le cartilage de conjugaison de l'enfant et du jeune animal.

Chez l'adulte, après la soudure diaphyso-épiphysaire, l'hormone somatotrope a une influence plus difficile à caractériser (Simonov et Korendiasev (197). Baïsset, Douste-Blazy, Montastruc et Planel (12) ont signalé qu'à son action sur le cartilage de conjugaison et sur l'anabolisme protéique s'ajoute son opposition à l'action ossifiante des hormones génitales.

L'hormone somatotrope agit sur le tissu conjonctif osseux et sans doute aussi sur les polysaccharides de la substance fondamentale. Pour certains auteurs, elle exerce une action favorable sur la consolidation des fractures, Bourde (29), Laborit (124). D'autres, au contraire, lui dénient toute action, Ulrich, Reinhardt et Li (209), Shepanek (194).

Nous pourrions rappeler ici la similitude ou la difficulté de séparation de l'hormone somatotrope et de l'hormone diabétogène. Celle-ci permet l'utilisation des composés cétoniques sanguins pour les besoins énergétiques de l'organisme. C'est ainsi que le déficit d'utilisation glucidique du diabète est compensé par une augmentation des composés cétoniques (Krebs) (121).

Cette hormone agit comme un antagoniste de l'insuline.

Dès lors tout un métabolisme va pouvoir dépendre de l'hormone hypophysaire. Ce que nous savons du métabolisme glucidique et lipidique dans l'organisme diabétique nous permet d'envisager une série de modifications du métabolisme lipidique. L'hypercholestérolémie, l'hyperlipémie, la cétoacidose du diabète représentent l'exagération des tendances réalisées chaque jour dans les organismes normaux sous l'influence de l'hormone hypophysaire diabétogène.

Nous devrons donc penser à l'influence des hormones hypophysaires lorsque nous étudierons les lipides cellulaires de l'os.

B) *Les glandes génitales.*

On connaît depuis l'antiquité les modifications staturales entraînées par la castration pratiquée dans le jeune âge. Riddle (172) avait signalé, en 1926, que les stéroïdes génitaux, œstrogènes en particulier, augmentent la fixation du calcium chez les oiseaux et certains mammifères.

Cette notion a permis à Reifenstein et Albright (171) de traiter avec succès les ostéoporoses par les œstrogènes ou les androgènes.

L'action des hormones génitales varie suivant les doses administrées :

— à faible dose, elles excitent la prolifération du cartilage sérié ; elles agissent alors comme l'hormone somatotrope ;

— à forte dose, elles inhibent les cellules du cartilage sérié et elles diminuent l'épaisseur du cartilage de conjugaison. Elles ont un effet catabolique, Baïsset et collaborateurs (12). Lichtwitz (138).

Mais le mécanisme d'action de ces stéroïdes ne tient pas à une fixation plus marquée des sels minéraux. La castration largement pratiquée chez les jeunes animaux ne cause aucune décalcification du squelette. Il s'agit, pour Albright (2) d'une modification de la trame organique, de son métabolisme protéique.

Chaque hormone génitale a une action propre :

Les œstrogènes à dose suffisante entraînent une nette atrophie du cartilage de conjugaison et font apparaître une bande de calcification métaphysaire juxtacartilagineuse, Baïsset, Douste-Blazy, Montastruc et Planel (10).

Au niveau de l'os dont le taux d'azote augmente, les travées sont épaissies alors que l'accroissement de la fixation calcique est possible (Gardner et Pfeiffer) (80), mais non constant. Après avoir provoqué la transformation en ostéoblastes des cellules mésenchyma-

teuses péricapillaires des axes conjonctivo-capillaires, les œstrogènes assurent donc l'ossification de la partie inférieure du cartilage sérié par hypertrophie puis dégénérescence de ses cellules. Les axes conjonctivo-vasculaires prolifèrent, pénètrent à l'intérieur des cellules dégénérées et créent au milieu des débris cartilagineux une ossification haversienne définitive, Baïsset et collaborateurs (10).

Les œstrogènes vont ainsi prendre place dans un système de régulation complexe avec les glandes hypophysaire, thyroïdienne et cortico-surrénalienne.

La testostérone excite à faible dose la sécrétion d'hormone somatotrope et la prolifération du cartilage sérié ; à forte dose au contraire, elle freine l'hypophyse et inhibe le cartilage sérié, Baïsset, Douste-Blazy, Montastruc, Planel et Virenque (11).

Les androgènes exercent surtout une forte action d'anabolisme protéique. Ils peuvent eux aussi agir favorablement sur les ostéoporoses.

C) *La cortico-surrénale.*

Les hormones corticales utilisées en thérapeutique, et en particulier la cortisone, paraissent pouvoir déclencher un certain nombre de troubles osseux : ostéoporoses du stress, de la maladie de Cushing, ostéoses des traitements cortisoniques.

Sans doute, ces troubles ne deviennent pathologiques que dans certains cas. Il semble qu'une perturbation de l'équilibre des cinq glandes que nous indiquions plus haut soit alors en cause. De même que toutes les femmes ne font pas une ostéoporose lorsqu'au moment de leur ménopause elles disposent de moins d'œstrone, tous les sujets traités par la cortisone et ses dérivés ne font pas des ostéopathies et des ostéolyses.

D) *La thyroïde.*

Depuis que l'on a constaté l'arrêt de croissance et les retards d'ossification des cartilages de conjugaison déclenchés par la thyroïdectomie chez le jeune animal et que l'on a retrouvé ces signes dans le myœdème humain, on attribue à la glande thyroïde un rôle dans le maintien de l'équilibre protéino-minéral de l'os.

Baïsset, Douste-Blazy, Montastruc, Planel et Virenque (10-11) ont montré que l'hormone thyroïdienne agit comme les œstrogènes sur le cartilage de conjugaison et exerce une action inverse sur le tissu osseux : atrophie des travées ostéoïdes et diminution de la teneur en azote et en calcium.

Les troubles osseux de l'hyperthyroïdie, la déperdition considérable du calcium et du phosphore chez l'hyperthyroïdien ont confirmé le rôle de la glande vis-à-vis de l'os. Ce rôle paraît être indirect et tient vraisemblablement à une action métabolique générale (Cartier) (39).

E) *Les parathyroïdes.*

La connaissance de la fonction parathyroïdienne est née de la concordance reconnue par Askanasy (8) et par Erdheim (69) en 1907 d'ostéopathie fibro-kystique et d'adénome parathyroïdien.

L'isolement d'une hormone (Collip) (46) et l'hyperparathyroïdie provoquée qu'elle a permis de réaliser ont complété les données acquises par les premiers auteurs, sur le rôle de la parathyroïde dans le métabolisme osseux.

Les perturbations du métabolisme minéral dans l'hypo- et l'hyperthyroïdie ont suscité deux théories principales sur le mode d'action de l'hormone parathyroïdienne.

1° Thomson et Collip (206) envisagent une stimulation des ostéoclastes. Cette stimulation mettrait en circulation une quantité importante de calcium (Munson) (148) et irait sans doute de pair avec l'augmentation du métabolisme général des ostéoclastes. Dès lors l'hypothèse d'une participation lipidique peut être posée. A la libération calcique s'ajouterait une dépolymérisation des mucopolysaccharides de la substance fondamentale.

Jaffe (112) met en cause une solubilisation initiale du sel de l'os dans le liquide interstitiel qui le baigne.

2° Albright et Ellsworth (3) attribuent l'action parathyroïdienne à un abaissement du seuil rénal des phosphates par diminution de leur réabsorption dans les tubes rénaux.

Mais l'action directe de la parathormone sur le système osseux n'est pas exclue puisque l'hypercalcémie qu'elle provoque survient chez des chiens néphrectomisés (Stewart et Bowen) (203). Cette glande pourrait dès lors sécréter deux hormones, l'une agissant sur l'os par un mécanisme inconnu, l'autre réglant la réabsorption tubulaire des phosphates.

V. — L'OS FRACTURE

Le traumatisme osseux va déclencher des réactions histochimiques complexes qui aboutissent à la formation d'un tissu intermédiaire qui s'ossifiera et auquel on donne le nom de cal.

La difficulté d'obtenir chez l'homme des pièces anatomiques entières, la seule pratique de fractures expérimentales chez de petits animaux dont les réactions ne sont peut-être pas identiques à celles de l'homme, expliquent que pendant longtemps de nombreux points aient été laissés dans l'ombre.

Actuellement, l'aspect histologique de l'évolution d'une fracture est bien précisé, mais son étude biochimique est encore incomplète.

Pour la réparation histo-anatomique, Leriche et Policard (133) indiquaient déjà, il y a plus de trente ans, que « le phénomène biolo-

giquement le plus essentiel, bien qu'histologiquement discret, est constitué par la résorption lente, mais progressive du tissu osseux des extrémités fracturées ».

Cependant, il n'est plus possible de considérer uniquement le point de vue anatomique dans la formation du cal et de suivre seulement la réparation *in situ*.

L'étude biochimique de l'évolution d'une fracture doit être suivie localement et à distance.

Localement l'analyse du cal donne, certes, des résultats précieux, mais un déséquilibre minéral important est provoqué par la réparation de la fracture ; il retentit sur les zones squelettiques voisines et éloignées ; il doit être recherché par l'analyse des diverses zones de l'os fracturé et de l'os symétrique. Le retentissement de la fracture sur tout le métabolisme minéral, immédiatement et pendant la consolidation, est un point important de la biochimie osseuse.

Mais si, comme le dit Laurence (128), il faut s'attarder sur ce transfert minéral suivi de soudure, parce qu'il est essentiel et que nous pouvons le surveiller radiographiquement, son étude chimique est plus difficile.

La connaissance des mécanismes biochimiques osseux a fait de grands progrès grâce à l'utilisation des isotopes radioactifs et, en particulier du Phosphore 32, car son comportement vis-à-vis de l'os est très comparable à celui du calcium et il présente sur ce dernier de nombreux avantages de manipulation et de mesure (40).

On a ainsi pu effectuer une étude dynamique des transferts minéraux phosphorés et calciques.

Cependant les transferts minéraux ne doivent pas nous faire oublier les autres aspects biologiques de la consolidation osseuse, en particulier ses aspects protéiques et enzymatiques.

A) Histologie

Le phénomène essentiel de la consolidation est un rajeunissement local, une véritable explosion embryonnaire qui ramène le foyer à un état de prolifération, de vitalité, de puissance édificatrice depuis longtemps oubliées (Laurence) (128).

Une fracture entraîne toujours des dégâts qui prédominent entre les fragments. Une quantité variable de sang s'épanche entre eux et autour d'eux, infiltrant les espaces cellulaires voisins, le périoste, les muscles. Le sang coagule très vite et on voit s'organiser une masse fibrineuse dans laquelle baignent des débris variés, musculaires, fibreux, osseux, et des gouttelettes graisseuses s'échappant avec le sang de la moelle ouverte.

Anatomiquement ce foyer traumatique va être le siège de profondes modifications que l'on peut schématiquement séparer en trois phases :

a) Premier stade : envahissement par des fibroblastes ;

b) Deuxième stade : formation du cal primitif ;

c) Troisième stade : formation du cal définitif.

A) Premier stade : envahissement fibroblastique.

La masse fibrineuse formée par l'hématome et les débris qu'il contient est rapidement envahie par des capillaires néoformés et des fibroblastes qui la remanient et la transforment en tissu conjonctif embryonnaire.

Ces remaniements sont accompagnés d'une forte hyperémie régionale qui touche le périoste et les tissus conjonctifs voisins les ramenant à un état embryonnaire. Les extrémités osseuses sont le siège d'une résorption intense, débutant très rapidement après le traumatisme.

Dès lors, pour Leriche et Policard (133), toutes les conditions sont réalisées pour l'ostéogénèse. Un vaste milieu ossifiable est constitué, et, dans son voisinage, de l'os en résorption libère des éléments calcaires, créant une surcharge calcique locale. Des travées de tissu osseux jeune apparaissent bientôt aux angles d'union du périoste avec la diaphyse, tout près de l'os, dans le tissu conjonctif organisé de l'ancien caillot et, de là, grossissent peu à peu jusqu'à ce que les deux masses qu'elles forment arrivent à s'unir.

B) Deuxième stade : formation du cal primitif.

La marche de ces deux masses osseuses à la rencontre l'une de l'autre, à travers le cal conjonctif, n'est pas décrite de la même manière par tous les auteurs.

On a longtemps admis avec Ollier (155) que l'élément ostéoformateur essentiel est le périoste. Par sa couche profonde, ostéogène, le périoste édifie une virole externe, la moelle étant à l'origine d'une virole interne qui délimitera le canal médullaire. Ces deux viroles sont d'abord cartilagineuses. Ce stade cartilagineux est nécessaire à l'ossification qui prend donc le type endochondral.

Leriche et Policard (133) ont proposé une théorie très différente de l'ostéogénèse. L'apparition d'os se fait par métaplasie du tissu conjonctif sans qu'aucun stade intermédiaire soit nécessaire entre le stade conjonctif et le stade osseux.

Ces deux hypothèses diffèrent notablement. Le problème de savoir si le cal passe ou non par un stade cartilagineux reste posé.

On trouve très souvent des zones cartilagineuses dans les foyers de fracture en cours de consolidation. Jamais très homogène ce cartilage est disposé en plages, en nodules dans le cal conjonctif ou osseux. Il ne s'agit jamais d'un véritable cal cartilagineux. Ces nodules sont entourés d'une mince couche osseuse.

Il paraît donc normal d'admettre depuis les travaux de LERICHE, qu'il y a intrication de deux métaplasies et non ossification endochondrale vraie.

Il semble que les conditions qui président à la formation de ce cartilage soient essentiellement mécaniques, la métaplasie cartilagineuse n'apparaissant que lorsqu'il y a des mouvements anormaux du foyer de fracture, comme l'ont montré les expériences de FONTAINE (77) chez le chien.

Rôle des ostéoblastes.

L'étude histologique du foyer est celle qui rend compte le plus fidèlement des processus en cours. Tout ce qui se passe par ailleurs ne représente, en fin de compte, que le résultat de l'activité cellulaire locale. Quand on parle de « milieu ossifiable », de « gel », on ne doit jamais oublier que les matériaux mis à la disposition des cellules ne sont que des matériaux, et que leur accumulation, leur mise en place, leur organisation dépendent des éléments nobles (LAURENCE) (128).

Les stades initiaux de la fracture offrent les mêmes images histologiques que n'importe quel exsudat traumatique en voie d'organisation (WATSON-JONES) (212). L'envahissement de l'hématome par un tissu de bourgeonnement n'a rien de spécifique. Les particularités apparaissent au bout d'une semaine quand de minces couches d'os jeune se déposent autour des vaisseaux sanguins néoformés.

Etudiant ce processus d'ossification par des examens histologiques sur des pièces injectées, TRUETA (207) a montré qu'il commençait avec l'entrée en jeu des ostéoblastes. Bien que LERICHE et POLICARD y aient vu de simples fibroblastes, restreignant leur rôle au profit de l'état physico-chimique du milieu ossifiable, la plupart des auteurs confirment leur existence et leur rôle mais ils les font dériver d'une métaplasie des cellules conjonctives, des histiocytes ou même des leucocytes. Pour TRUETA (207) ils proviennent directement des cellules endothéliales des néo-vaisseaux et acquièrent leur pouvoir spécifique au contact d'un milieu à teneur calcique élevée.

Déjà HAM (95) avait été frappé par la contiguité entre vaisseaux et couches de néo-ossification. TRUETA (207) a montré des microphotographies de vaisseaux injectés, dont la paroi est formée de cellules endothéliales en division prenant le caractère d'ostéoblastes.

Le néo-vaisseau apporte donc tout : les matériaux de la construction, la main-d'œuvre et le plan.

Rôle de la moelle.

LERICHE et POLICARD (133) dénient tout pouvoir ossificateur spécifique à la moelle osseuse. Cependant certains travaux récents attribueraient les modifications de la substance préosseuse, qui précèdent la précipitation des sels phosphocalciques, à l'action d'un système enzymatique complexe dont les éléments proviendraient de la moelle osseuse (CARTIER) (37).

C) Troisième stade : modelage du cal primitif et formation du cal définitif.

Le cal péri-osseux primaire est loin de ressembler à l'os définitif. C'est un os fait de travées grêles, fragile, avec de grands espaces conjonctifs vides d'éléments hématopoiétiques.

Les détails de sa transformation en os lamellaire sont assez mal connus. Cet os apparaît lentement, en huit à dix mois. Ces phénomènes de modelage jouent au maximum dans la réparation des fractures du nourrisson.

B) Aspect biochimique

A) Minéralisation du cal.

Leriche et Jung (132) ont trouvé dès les premières 48 heures une augmentation de la teneur en calcium du cal conjonctif. Cet accroissement continue progressivement jusqu'au 11e jour.

A ce moment apparaissent des modifications importantes, minutieusement étudiées par Annersten (6).

Les matières azotées augmentent régulièrement, mais de manière plus modérée. Les rapports Ca/N et P/N ne cessent de croître durant la formation du cal (Roche) (181-182).

Watson-Jones (212) a invoqué trois modifications locales :

— Libération d'histamine et d'acétylcholine entraînant une hyperhémie locale dont l'effet se traduit sur les extrémités osseuses par une résorption ;

— Accroissement du taux des phosphatases (6 à 8 fois la valeur normale) dans l'hématome fracturaire en quelques jours : excès persistant environ 10 semaines ;

— Augmentation franche de l'acidité au cours des deux premières semaines.

Roche (179) et son école ont apporté des données fondamentales sur la biochimie des fractures, en caractérisant l'unité physiologique du système osseux, et en démontrant que le ravitaillement du cal osseux en sels minéraux ne fait pas intervenir uniquement la mutation phospho-calcique locale invoquée par Leriche et Policard (133). Enfin, il a insisté sur la dissociation à établir entre le processus local de réparation et les processus généraux qui accompagnent la formation du cal.

Une nouvelle étape a été franchie dans cette étude par l'utilisation du phosphore radioactif.

Après les premiers travaux de Bohr (24), de Judet et de ses collaborateurs (115), Cartier, de Bernard et Lagrange (41) ont pu étudier en détail chez le rat les modifications minérales survenant au niveau du cal, de l'os fracturé et les réactions générales du squelette.

1. — *Au niveau du foyer de fracture où va se reconstituer le cal*, la minéralisation évolue en deux phases :

a) Pendant les vingt premiers jours, la fixation du phosphore est faible et n'augmente que très lentement.

b) A partir du 20-25e jour, l'ébauche fibro-cartilagineuse qui s'est constituée pendant la phase précédente se calcifie rapidement et atteint en 10 jours un taux de 75 % de sa minéralisation totale.

2. — *Au niveau des extrémités des deux fragments osseux*, l'évolution se fait en trois phases :

a) Pendant les premiers jours, une condensation osseuse importante se produit ; l'enrichissement en phosphore atteint 20 %. Mais cette condensation est temporaire.

b) A partir du 10e jour, la teneur de l'os en sels minéraux s'abaisse rapidement. Phénomène essentiel, cette chute est rapide et importante puisqu'elle atteint et dépasse 30 % de l'état initial.

c) A partir du 25e jour, la fixation reprend et se poursuit parallèlement à la minéralisation du cal.

3. — *La diaphyse de l'os fracturé*, à distance de la fracture, subit elle aussi de profonds remaniements :

a) Déminéralisation immédiate augmentant jusqu'au 25e jour (30 % environ).

b) Puis nouvelle fixation des sels minéraux identique à celle des extrémités osseuses, de sorte que la diaphyse reprend son taux normal de phosphore lors de la prise du cal.

4. — *Enfin l'ensemble du squelette* participe avec une moindre intensité aux mouvements successifs de déminéralisation dans le premier stade, de reminéralisation dans le deuxième — la mobilisation phospho-calcique déclenchée par le stress étant très précoce.

La minéralisation du cal évolue en deux phases nettement individualisées ; on les retrouve aussi bien chez l'animal adulte que chez l'animal en croissance (41).

La première étape, caractérisée par une lente fixation du phosphore correspond à la période initiale de l'ossification normale, c'est-à-dire à la transformation du support protéique banal en une matrice préosseuse.

Il paraît légitime d'identifier cette étape à la phosphorylation de la matrice, étape aboutissant à l'apparition des propriétés calcaffines du tissu osseux.

La dernière étape correspond à la minéralisation de la matrice protéique par le phosphate tricalcique. Le tissu osseux formé atteint d'emblée un taux de minéralisation maximum.

Par utilisation du phosphore radioactif, Cartier (40) a pu préciser l'origine du phosphore intervenant dans la réparation.

Les travaux de Roche et Roche (178) avaient mis en évidence l'existence de deux fractions du « sel de l'os » ayant un rôle différent :

— une fraction labile, siège d'échanges ioniques intenses avec le milieu extérieur ;

— une fraction stable incorporée à l'intérieur de la structure minérale et ne participant pratiquement plus à l'équilibre phospho-calcique.

En marquant la première fraction, par injection de phosphore 32, 24 heures avant la fracture et la deuxième par injection 20 jours avant, Cartier (41) a constaté que la participation du squelette à la réparation se fait uniquement aux dépens de la fraction labile du « sel de l'os ».

B) Rôle de la trame protéique.

Mais si l'étude des phénomènes portant sur l'élément minéral est très importante, elle ne peut, à elle seule, expliquer le mécanisme de la calcification.

Celle-ci s'accompagne ou est précédée de modifications de la substance pré-osseuse. Il est donc intéressant d'étudier les aspects organiques de la réparation des fractures.

Les modifications biochimiques des mucopolysaccharides au cours de l'ossification ont été étudiées par l'observation de la distribution, du métabolisme et de l'excrétion du soufre radioactif, en particulier par Dziewiatkowski (64).

Leur présence dans les cellules cartilagineuses a été démontrée par Belanger (19).

Duthie (63) a utilisé simultanément le soufre 35 et le phosphore 32 dans l'étude de la croissance et de la consolidation osseuse, pour obtenir des précisions sur la minéralisation des mucopolysaccharides.

Le dépôt dans les épiphyses et le périoste du soufre radioactif est considéré comme l'indication de la synthèse et de l'utilisation des mucopolysaccharides et de l'acide chondroïtine-sulfurique en particulier.

Mais les phosphates radioactifs n'apparaissent qu'après la dégénérescence des cellules cartilagineuses et le passage des mucopolysaccharides dans la substance intercellulaire, en même temps que des capillaires et des phosphatases alcalines (Siffert) (196).

Lacroix (126) a décrit la localisation du soufre radioactif dans les systèmes de Havers en formation. Mais pour Wislocki (219) les mucopolysaccharides observés au niveau du cal seraient différents de l'acide chondroïtine-sulfurique du cartilage normal.

Le chondroïtine-sulfate est considéré comme le « facteur local » de l'ossification (Boyd) (30).

Dans le cartilage, l'acide chondroïtine-sulfurique joue un rôle dans la liaison des cations et peut être inclu dans les mécanismes de la calcification (Sobel) (199) en formant un complexe chondroïtine-

sulfate, collagene, calcium qui pourrait constituer les noyaux de la cristallisation.

Etudiant la composition en sels minéraux et en substance fondamentale de cartilage hyalin, de cartilage ossifié et d'os de veau, Dulce (60) a mis en évidence, parmi les divers facteurs locaux de l'ossification, une division du chondroïtine-sulfate, une augmentation de la substance fondamentale et une accumulation du phosphate et non, comme on le croyait auparavant, la synthèse de novo du chondroïtine-sulfate et l'accumulation du calcium. En effet, la teneur en chondroïtine-sulfate et en calcium est plus élevée dans le cartilage hyalin que dans le cartilage en voie d'ossification embryonnaire ou épiphysaire d'animaux du même âge. Il a comparé l'activité enzymatique du cartilage hyalin et du cartilage en voie d'ossification (61). Etudiant la phosphatase alcaline, l'ATP phosphatase, la pyrophosphatase, la phosphorylase d'une part, les systèmes enzymatiques formant les hexosamines d'autre part, il a constaté que la transphosphorylase est plus active dans le cartilage en voie d'ossification que dans le cartilage hyalin. Par contre, la formation d'hexosamine n'est pas augmentée.

Les cellules actives au cours de l'ossification, les ostéoblastes doivent agir, par l'intermédiaire des enzymes transphosphorylants, en concentrant les phosphates dans la zone d'ossification.

Dans une dernière étape, Dulce a pratiqué de nouveaux essais sur des animaux rendus rachitiques par un régime approprié et sur des animaux fracturés (62).

Nous conclurons en disant que, grâce aux modifications de la trame protéique et à la participation des mucopolysaccharides, la réparation des fractures s'effectue suivant un processus d'ossification analogue à l'ossification physiologique, mais plus rapide. Aucun auteur ne met en cause une action lipidique.

VI. — LES LIPIDES DE L'OS

Notre rapide étude de la structure et de la formation du tissu osseux nous permet de concevoir que l'os, même chez l'adulte, présente un métabolisme très actif.

La labilité du tissu osseux ne se limite pas à ses échanges minéraux ; la matière organique de l'os qui fixe très rapidement le glycocolle marqué par C_{14} dans ses ostéoblastes, la substance fondamentale qui incorpore aussi vite le soufre 35 dans ses mucopolysaccharides, se renouvellent, elles aussi, continuellement.

Cette activité métabolique de l'os sur laquelle Cartier a récemment insisté (37) demande un équipement tissulaire complet.

Les lipides ne peuvent faire défaut dans cet équipement.

— Le rôle des lipoprotéines,

— L'importance des lipides des cellules,

- dans l'hydratation et la perméabilité cellulaire,
- dans les granules,
  - mitochondries contenant 58 à 79 % de lipides,
  - microsomes qui en ont 63 à 72 % (Ada) (1) (Kretchmer) (122),
- dans la constitution des enzymes : 61 % de lipides dans la succinodéhydrase des mitochondries du cœur de porc,

sont autant de raisons qui militent en faveur de la nécessité d'un métabolisme lipidique actif du tissu osseux, même si ces constituants sont en petite quantité.

A) Os normal.

Parmi les constituants organiques de l'os, les lipides sont assurément ceux qui ont été les moins étudiés.

Les données anciennes accordaient une grande place aux lipides dans la composition de l'os.

Les données récentes considèrent que les lipides sont beaucoup moins abondants ou même absents, si on considère uniquement le tissu osseux proprement dit et non l'os entier avec sa moelle.

Pourtant, l'os est formé de cellules noyées dans une substance fondamentale. Donc si ce tissu possède des cellules, il doit contenir des lipides.

a) *Cellules et Lipides.*

Les lipides sont indispensables à toute structure cellulaire, aux processus d'échanges et par conséquent au métabolisme.

Les constituants cellulaires indispensables présents dans le cytoplasme contractent des liaisons variées avec les filaments protéidiques.

Les phospholipides créent les liaisons avec les protéines ; les autres lipides (stérols, glycérides) sont fixés aux phospholipides (Polonovski) (165).

Les microsomes sont très riches en lipides, ainsi que les mitochondries qui contiennent particulièrement des phospholipides et de la vitamine A.

Le noyau contient également des lipides, ainsi que le nucléole.

Les phospholipides jouent un rôle important dans la formation des « membranes cellulaires », que ce soit autour de la cellule, du noyau, des mitochondries, des vacuoles.

Enfin une proportion importante de phospholipides est liée aux acides ribonucléiques.

b) *Cellules conjonctives et Lipides cellulaires.*

Le tissu osseux dérive du tissu conjonctif du mésenchyme qui possède des lipides.

Celui-ci est constitué par :

— des cellules,

— des fibres protéiques,

— une substance fondamentale.

1. *Les cellules.* Parmi les cellules réticulaires ou histiocytes, certaines ont des propriétés phagocytaires. Le nom de lipophages qui leur a été donné, à côté de celui de macrophages, indique une présence lipidique.

Les fibroblastes qui jouent un rôle primordial dans la construction du tissu conjonctif sont porteurs de lipides protoplasmiques comme toute cellule biologiquement active.

2. *Les fibres.* Fibres de collagène et de réticuline, fibres élastiques ont été peu étudiées quant à leur éventuelle teneur en lipides et phospholipides. Seuls Gies et ses collaborateurs (101-210) donnent les résultats suivants :

%	Tissu fibreux Tendon d'Achille de bœuf	Tissu élastique jaune Ligament de la nuque
Eau : 60 à 65 Matières solides : 35 à 40		
	Collagène 31,6	7,2
	Elastine 1,6	31,6
	Mucoïde 1,2	0,5
	Mat. grasses 1,04	1,12

Bornes (27) indique que le collagène contient 0,1 % de lipides.

3. *La substance fondamentale.* Elle doit au moins servir de passage à des composés lipidiques.

Elle n'a pas seulement le rôle de support des éléments qu'elle emprisonne, mais elle règle le métabolisme de l'eau et des sels, les échanges des protéines dans leurs rapports avec les éléments différenciés qui les utilisent ; elle stocke également les produits de réserve (de Brux) (33).

Mais seuls ses deux constituants protéiques, collagène acido-soluble et collagène alcalino-soluble, ses constituants mucopolysaccharidiques (acide hyaluronique, acide chondroïtine-sulfurique, acide kératosulfurique) liés aux protéines par des liaisons salines, ont fait l'objet de nombreuses recherches.

c) *Cellules osseuses et Lipides.*

La présence des lipides dans l'os est connue depuis très longtemps.

De Gorup-Besanez (87) écrit en 1875 : « Les os renferment de l'eau et de la graisse. Ces substances n'appartiennent pas plus au tissu osseux proprement dit que les chlorures et les sulfates alcalins, qui s'y trouvent également. Elles doivent être plutôt attribuées aux vaisseaux sanguins des os et aux membranes des cellules et des canalicules des corpuscules osseux, ainsi qu'au contenu des canaux médullaires ».

Quelques auteurs s'intéressèrent à la teneur en lipides de l'os mais seulement de l'os total. Nous donnons le tableau d'Aron sur la teneur en graisse des os de l'homme (7).

Tableau N° IV

Teneur en graisse des os frais (Von Aron)

O S	Teneur en graisse des os frais %
Fémur	25,57
Tibia	19,69
Os du tarse	16,61
Os du métatarse et phalanges	11,30
Humérus	26,88
Radius	14,50
Os du carpe	14,87
Os du métacarpe et phalanges	10,93
Maxillaire	3,77
Orbite	3,94
Crâne	9,57
Pubis	17,08
Sacrum	17,54
Premières côtes	3,55
Côtes	3,78
Fausses côtes	4,05
Atlas	1,25

Il fallut attendre de nombreuses années pour que certains auteurs envisagent l'étude des lipides de l'os proprement dit.

Pourtant les histologistes avaient montré l'existence de lipides dans les cellules osseuses : Dubreuil (59), dès 1910, avait décrit la présence de vacuoles contenant des substances lipoïdes dans le cytoplasme des ostéocytes, des ostéoblastes et ostéoclastes.

Hill (105) confirma ces travaux en 1936, ainsi que Pritchard (167) utilisant le Noir Soudan pour caractériser des graisses dans la région de l'appareil de Golgi. Mais il ne leur était pas possible de confirmer la présence de phospholipides. Newlin et Mc Cay (151) avaient signalé la présence des lipides dans certains espaces osseux.

Sur le plan chimique, les lipides de l'os proprement dit ont été le point de départ de travaux peu nombreux. Leur étude devrait bénéficier des progrès accomplis récemment dans l'extraction des lipides et dans leur fractionnement.

Nous envisagerons d'abord les lipides de l'os compact, puis nous dirons quelques mots des lipides de la moelle pour montrer l'entière indépendance de ces deux fractions des lipides de l'os.

I. Les lipides de l'os compact.

Dans une monographie complète et récente sur les lipides, Deuel (52) cite seulement dans ce tissu l'existence d'une lécithinase signalée par King (117).

Weidman dit que la sphyngomyéline qui est jugée promouvoir la calcification *in vivo* est la principale substance préparée par extraction au moyen des solvants des lipides. Elle représente 0,1 % de l'os de bœuf (213).

Pikulev (161) dose le cholestérol dans l'os après déminéralisation chlorhydrique et trouve des taux infimes (de 2 à 3 mg pour 100 g de substance organique). Cet auteur pense que le cholestérol osseux est sous forme combinée à des protéines.

Enfin, nous rapportons dans le tableau n° V le taux des lipides de fémur de différentes espèces animales signalées par Spector (201).

Tableau N° V

Lipides totaux osseux de différentes espèces animales (Spector)

Espèces animales	Bœuf	Lapin	Chien	Rat
Lipides totaux	0,1 % de tissu sec	0,1 % de tissu sec	13 % de tissu frais	5 à 7 % de tissu frais

Récemment, Leach (130) a fractionné les lipides de fémur de bœuf et a isolé des triglycérides, du cholestérol, des esters de cholestérol, des phospholipides et probablement du β-carotène dont les quantités sont rapportées dans le tableau n° VI. L'auteur insiste sur l'état sous lequel se trouve le cholestérol et il estime que le cholestérol libre est plus abondant que la forme complexée à l'osséine.

Tableau N° VI

Composition des lipides extraits d'os compacts de bœuf (Leach)

	en grammes pour 100 g de lipides	en grammes pour 100 g d'os compact
Triglycérides	79,2	0,0535
Cholestérol libre . .	13,3	0,0089
Cholestérol estérifié .	1,7	0,0011
Phospholides	2,2	0,0015

Holmberg et Rosenqvist (106) ont analysé les lipides d'os de cheval comparativement avec ceux de mouton et de porc ; ils concluent à des ressemblances avec les lipides d'autres organes d'un même animal. La seule différence est leur teneur en acide palmitique qui est indépendante du taux des acides non saturés.

Les lipides osseux contiendraient de faibles proportions d'acide laurique et peut-être des acides caprique et caprylique.

Cette lacune dans la biochimie analytique du tissu osseux est d'autant plus surprenante que certains auteurs (Wells) (215) ont insisté sur le rôle des lipides dans la précipitation des sels calciques et par conséquent, dans la minéralisation de l'os, en invoquant le fait que le calcium et le magnésium se fixent facilement aux acides gras.

Une autre preuve du rôle éventuel que peuvent jouer les lipides dans l'os est l'importance des vitamines liposolubles dans le tissu osseux.

Nous envisagerons plus loin ces vitamines et leur action.

Cependant nous pouvons signaler ici la découverte de Kodicek (118). Etudiant le devenir de la vitamine D (ergocalciférol marqué par du Carbone 14), il a trouvé dans les os 4 % de la dose totale de vitamine D répartie dans les différents tissus.

Claasen, Vogels et Wœstmann (45) ont montré par l'utilisation du phosphore 32, que le fémur et le tibia de rat blanc sont le siège de synthèses des phospholipides.

Ces expériences prouvent l'existence d'un métabolisme lipidique dans l'os compact.

II. Les lipides de la moelle osseuse.

Si les lipides du tissu compact ont fait l'objet de peu de travaux, par contre ceux de la moelle osseuse ont été mieux étudiés. Ce tissu est des plus riches en lipides. Pour Hutchinson et Mac Leod (108), il contient en moyenne chez le cheval 32,58 % de substance sèche comprenant 11,6 % de protéines et 17,9 % de substances solubles dans l'éther (graisse, lécithine, cholestérol).

Le taux lipidique est très variable de part et d'autre de cette moyenne. Nerking (150) indique chez le bœuf 92,1 % de graisses, dont 0,28 de cholestérol et 0,20 de lécithine.

Krause (120) en trouve 52 grammes pour 100 grammes de tissu sec.

Dietz (54) donne la composition suivante de la moelle de lapin :

Eau	39,0 à 63,5 p. 100
Résidu sec dégraissé	8,7 à 14,3 p. 100
Graisses	52,3 à 22,2 p. 100
Azote lipidique	61 à 131 mg d'N p. 100 g

Bien que Bernhard et Korrodi (20) aient signalé l'absence de phosphatides dans la moelle osseuse adulte, plusieurs auteurs les ont signalés (84) (157). C'est ainsi que Bolle (25) a montré que les

phospholipides varient dans d'étroites limites chez les différentes espèces animales (bœuf : 0,46 % - porc : 0,43 - mouton : 0,40 - chien : 0,83 - chat : 1,16).

La teneur en lécithine dépend de l'âge des animaux ; plus élevée chez les jeunes, elle s'abaisse avec l'âge (55), alors que les lipides totaux augmentent.

La nature des acides gras a été étudiée ; les acides saturés sont surtout composés d'acides palmitique et stéarique, tandis que le principal acide non saturé est l'acide oléique (104) ; Cheng (44) a signalé la présence de petites quantités d'acide arachidonique. Dans certaines conditions pathologiques (maladie de Gaucher), on observe une accumulation de cérébrosides dans la moelle osseuse.

Le métabolisme des lipides de ce tissu est modifié dans certaines conditions ; c'est ainsi que les rayons X accélèrent la synthèse des lipides à partir de l'acétate (5) et plus particulièrement celle des acides gras non saturés.

Il faut signaler l'action bactéricide d'extrait lipidique de la moelle osseuse qui se comporterait comme une bactériolysine (127).

Enfin dans le cadre de ces lipides de l'os, il faut mentionner les travaux de Levander (135-136) sur la substance ostéogénique qu'il isola du cartilage de conjugaison du lapin. Soluble dans l'alcool elle provoque le développement d'ostéome dans le muscle du même animal.

L'étude de cette substance, pour laquelle Lacroix (125) proposa le terme d'« ostéogénine », a été reprise avec plus ou moins de succès à partir d'extraits alcooliques d'os, de moelle osseuse, de périoste (Annersten) (6) - (Bertelsen) (21) - (Hartley) (100) - (Pfeiffer) (159) - (Heinen) (102).

La nature chimique de l'« ostéogénine » extraite par l'alcool a été étudiée : c'est la fraction lipidique de l'extrait qui paraît la plus active. Levander (134), Willestaedt (214) estiment qu'il s'agirait d'un phospholipide plus que d'un lipide pur ou d'un stérol. Schreiber (193), par des méthodes histochimiques, a confirmé cette hypothèse. Il s'agirait d'un phospholipide associé à des protéines, corps comparable au « protéolipide » isolé par Folch (73) du cerveau et de divers organes et constitué de phosphatides (sphingomyéline) et de cérébrosides en association avec 50 % de protéines.

B) **Os pathologique.**

On connaît bien les infiltrations lipidiques osseuses de la maladie de Gaucher et les dépôts plus rarement observés de la maladie de Niemann-Pick's.

Sans aller jusqu'à ces dyslipoïdoses, nous pouvons déduire d'un certain nombre de faits cliniques ou expérimentaux des signes de la perturbation d'un métabolisme lipidique osseux.

Nous signalerons en particulier les expériences de Bastiani, Fonzone et Lunardo (15). Elles montrent l'arrêt de la croissance du

squelette des jeunes rats par un régime hyperlipidique et la stéatose généralisée qu'il engendre.

La choline ajoutée au régime prévient l'infiltration grasse du foie et rétablit la croissance de l'animal.

Inversement, un excès de choline provoque un nouvel arrêt de la croissance osseuse.

Ces expériences paraissent montrer que les acides gras stimulent l'accroissement osseux tant qu'ils peuvent être métabolisés avec régularité.

Un autre fait permet de relier le métabolisme lipidique de l'os à l'intégrité du collagène.

On sait que la carence en lysine de jeunes rats provoque une perte de poids importante, Osborne et Mendel (156), et une diminution de leur calcification osseuse, Harris (98), Bavetta (16).

Mais en outre, la déficience en lysine provoque des symptômes d'un autre ordre, en relation avec le métabolisme non plus minéral et protidique, mais lipidique. Harris, Neuberger et Sanger (98) ont mis en évidence le dépôt de lipides dans les os longs (tibia) de rats absorbant un régime déficient en lysine. Ces résultats ont été confirmés par Rohdenburg (188).

Tableau N° VII

Effets de la lysine sur la croissance du rat et la composition du tibia

ANALYSE DES TIBIAS REUNIS DE 6 RATS								
Régime	L-lysine dans le régime	Gain en g. (5 semaines)	Poids du tibia brut	Eau %	Lipides %	Cendres %	Résidu organique %	Protéines (N×6,25) %
Pain (contrôle) ..	0,29	84	1,7600	38,03	4,39	36,59	20,99	19,31
Pain + 0,2 % de Monochlorhydrate de L-lysine	0,45	143	2,1852	38,59	3,12	36,88	21,41	20,68
Pain + 0,5 % de Monochlorhydrate de L-lysine	0,69	186	2,5693	39,50	2,39	36,59	21,52	21,31
Pain + 1,0 % de Monochlorhydrate de L-lysine	1,09	187	2,5566	39,11	2,70	36,20	21,99	20,12
Régime normal ..	1,10	204	2,2750	40,06	2,32	36,09	21,53	19,87

C) Os fracturé

Nous avons vu que les lipides de l'os avaient été très peu étudiés tant au point de vue de leur nature chimique qu'au point de vue de leur rôle éventuel dans l'ossification.

Le devenir des lipides de l'os pendant l'évolution et la réparation d'une fracture, leur participation aux divers mécanismes qui conduisent à la consolidation n'ont pas été envisagés sur le plan chimique. Nous n'avons pu relever que des études histochimiques sur ce chapitre.

Se basant sur le fait que l'on accordait de plus en plus d'importance aux substances lipidiques dans les phénomènes de la vie cellulaire, Borghese (26) le premier, voulut préciser dans quelle mesure ces lipides pouvaient contribuer au processus de l'ossification.

Utilisant les méthodes histochimiques alors connues pour séparer les différentes fractions des lipides cellulaires, il compara les lipides de la cellule cartilagineuse à ceux de l'ostéoblaste.

Les lipides sont beaucoup plus abondants dans les cellules du cartilage hypertrophique que dans les cellules du cartilage hyalin. Puis leur taux baisse au niveau des ostéoblastes.

Pour cet auteur, le 1/3 environ de ces lipides est constitué par des phospholipides. Ces lipides subissent des modifications dans leur structure pendant la transformation de la cellule cartilagineuse en ostéoblaste, traduites par des différences de colorabilité entre ces deux cellules.

Il conclut que ces lipides doivent participer au métabolisme phosphoré comme vecteurs d'une partie du phosphore nécessaire aux processus d'ossification.

Ces travaux furent repris par Nicolosi et Petrina (154). Recherchant les lipides dans les tissus néoformés pendant l'évolution des fractures, ils montrèrent leur présence dans toutes les cellules qui participent aux processus ostéoréparateurs et arrivèrent à la conclusion que les propriétés enzymatiques qu'ils possédaient, favorisaient la précipitation des sels de calcium dans la substance osseuse préformée. Ces lipides se trouvent sous forme de granules ou de gouttelettes à siège nucléaire, et plus rarement protoplasmique, dans les fibroblastes, les cellules cartilagineuses et les ostéoblastes.

La différence quantitative rencontrée dans les diverses phases de la réparation est en relation avec la demande fonctionnelle des éléments ostéogénétiques.

Pour ces auteurs, certains retards de consolidation doivent être rapportés à une altération du métabolisme lipidique. Par contre, ce rôle des lipides a été mis en doute par Mignogna (145). Pour lui les lipides des cellules du tissu de réparation se présentent sous forme de granules isolés ou groupés, à siège essentiellement nucléaire, quel que soit le moment de l'observation, sans variations quantitatives

durant les diverses phases de la calcification. L'augmentation initiale n'est due qu'au fait que les lipides sont abondants dans les tissus à activité fonctionnelle élevée, tissu conjonctif jeune, tandis qu'ils diminuent progressivement au fur et à mesure que le tissu conjonctif devient adulte.

Enfin, cet auteur tire argument contre la participation des lipides à la réparation osseuse, de leur présence dans le noyau, exceptionnellement dans le cytoplasme, ce qui laisse supposer que ces lipides font partie des phospholipides normalement contenus dans tout noyau cellulaire.

DEUXIÈME PARTIE

Recherches personnelles

DEUXIEME PARTIE

Recherches personnelles

Les résultats contradictoires rapportés par différents auteurs nous ont amenés à extraire et à doser les lipides de l'os de plusieurs espèces animales, du rat et du chien en particulier.

Devant l'insuffisance des connaissances classiques sur le rôle et le devenir des lipides pendant la consolidation des fractures, il nous a paru intéressant de suivre le devenir de ces lipides de l'os au cours de l'évolution des fractures. Nous avons effectué d'abord des recherches sur le rat, car cet animal est le plus pratique des animaux d'expérience, et dans un deuxième temps sur le chien.

Les extraits lipidiques obtenus ont été soumis à un fractionnement par chromatographie sur colonne et chromatographie sur papier.

I. - MATÉRIEL ET TECHNIQUE

A) Expérimentation physiologique

Nous avons pratiqué des fractures chez le rat et chez le chien.

1. Chez le rat.

Nous avons utilisé des rats adultes, par lots de 20 animaux environ, de même souche, de même âge et également répartis au point de vue sexe pour éliminer de possibles variations entre les taux lipidiques des rats de sexe masculin et féminin.

Sous anesthésie générale à l'éther, réalisée sous une cloche, nous avons pratiqué sur chaque rat une fracture de la diaphyse humérale et de la diaphyse tibiale du même côté. Cette technique est facile à réaliser.

Les fractures obtenues étaient très semblables les unes aux autres, le déplacement était en général très minime. Nous n'avons pas eu d'ouverture du foyer de fracture.

Les animaux replacés dans leur cage sortaient rapidement de la période anesthésique, l'intervention ayant été très rapide. La gêne fonctionnelle occasionnée par une telle agression, double mais unilatérale, était minime et au bout de 4 à 5 jours, les animaux avaient repris une activité normale.

Une consolidation satisfaisante était obtenue entre 20 et 30 jours. Evidemment, la consolidation de ces fractures non immobilisées n'était pas parfaite au point de vue de la conservation des axes. Un cal solide était cependant obtenu dans la totalité des cas.

Nous n'avons pas observé de pseudarthrose clinique.

Malgré les conclusions apportées par Fontaine (77) au cours de son étude de la consolidation des fractures expérimentales chez le chien : une fracture mal immobilisée se termine habituellement par une pseudarthrose très serrée, mais pseudarthrose quand même, nous avons utilisé cette technique pour sa simplicité et à cause des conclusions portées par Roche (183) : les modifications biochimiques qui se produisent au niveau du foyer de fracture sont indépendantes dans une certaine mesure de l'évolution du cal et se produisent même lorsque le cal donne naissance à une pseudarthrose fibreuse.

Après leur avoir donné un régime alimentaire normal, bien équilibré et toujours identique, nous avons tué ces rats, par lots, à des intervalles différents : 10 jours, 20 jours, 1 mois, 2 mois après la fracture.

2. Chez le chien.

Au point de vue minéral, Fontaine (77) a montré que la fracture d'une pièce osseuse donne une répercussion à distance sur le squelette, beaucoup plus faible chez les animaux de grande taille, et en particulier chez le chien, que chez les petits animaux : pigeon, rat, telle que l'a décrite Roche (179).

Nous avons voulu préciser si on observait les mêmes modifications dans la teneur en lipides des différentes parties du squelette chez le rat et chez le chien.

En plus, nous avons cherché à mettre en évidence les modifications lipidiques éventuelles du cal provoquées par l'ostéosynthèse, et à l'opposé, par la formation d'une pseudarthrose.

L'anesthésie générale a été pratiquée par injection intraveineuse de 0,10 g de chloralose par kilogramme de poids ; anesthésie suffisante qui, à l'aide d'une anesthésie locale pour l'incision de la peau, nous a permis de pratiquer l'intervention.

Nous avons ainsi traité 3 chiens.

Sur chacun, nous avons pratiqué au niveau de la patte avant droite une fracture simple par manœuvre externe, ces fractures ont été maintenues rigoureusement par immobilisation plâtrée.

Sur les pattes postérieures gauches, avec des précautions d'asepsie identiques à celles que l'on utilise en chirurgie orthopédique, nous avons créé une fracture oblique du 1/3 moyen du tibia en

sciant celui-ci, à la scie de Gigli, en évitant au maximum de créer de trop grosses lésions aux parties molles et au périoste.

Dans deux cas, la fracture a été traitée par ostéosynthèse très solide à l'aide de deux vis. La contention était renforcée par un plâtre.

Sur le troisième chien, nous avons cherché à obtenir une pseudarthrose par l'interposition de fibres musculaires entre les fragments. Nous avons d'ailleurs été favorisés dans cette voie par le chien lui-même qui a mal supporté tout plâtre, les détruisant les uns après les autres, quelles que soient les précautions utilisées dans leur confection.

Les suites opératoires ont été excellentes.

Dès le lendemain et malgré leur plâtre, les animaux avaient retrouvé une vie relativement active, supportant très bien l'immobilisation de leurs membres. Nous avons eu un seul incident, mineur, un plâtre d'une patte antérieure à refaire, car il serrait trop.

Ces chiens ont reçu une alimentation suffisamment riche et variée, identique pour tous.

Nous avons sacrifié le premier chien au bout de 15 jours, les deux autres au bout de 36 et 40 jours.

Macroscopiquement (et radiologiquement), le premier chien présentait très peu de cal au niveau de la fracture du tibia vissée ; une ébauche de cal plus important au niveau de la patte avant.

Chez le deuxième chien, nous avions macroscopiquement et radiologiquement, une consolidation définitive au niveau des deux fractures. Le cal était fusiforme, peu hypertrophique sur l'humérus. Le cal de la fracture vissée, malgré la bonne tenue du montage, était plus hypertrophique.

Le troisième chien présentait au niveau de la patte avant les mêmes caractéristiques que le chien précédent ; par contre, au niveau de la patte arrière, on notait les caractères macroscopiques et radiologiques d'une pseudarthrose confirmée avec, en particulier, hypertrophie réactionnelle importante au niveau des deux extrémités osseuses, entourées d'un manchon fibreux.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes demandés dans quelle mesure le phosphore minéral qui se dépose au niveau du cal à partir du 20e au 25e jour (Bohr) (24) - (Cartier) (40), pourrait jouer un rôle dans la formation des phospholipides que nous nous proposions d'étudier au niveau de ce cal.

Pour cela, nous avons injecté dans le tissu cellulaire sous-cutané du phosphore radioactif à nos deux derniers chiens, dans un cas 12 heures, et dans l'autre 24 heures avant la mort.

B) Expérimentation chimique

Préparation des extraits lipidiques

Immédiatement après la mort de nos animaux, nous avons prélevé les pattes et entrepris la dissection soigneuse de chaque diaphyse fracturée.

Lorsque nous avions un lot important d'animaux dont il était impossible de terminer rapidement la dissection, les pattes étaient conservées dans une chambre froide à — 20°, enveloppées pour éviter la dessication, jusqu'au moment de leur traitement.

La dissection méthodique de chaque diaphyse a eu pour but d'éliminer toute trace de muscle, aponévrose, tendon, en respectant au maximum le cal lui-même.

Nous avons également éliminé les épiphyses de ces os fracturés, ne gardant que l'os compact, la diaphyse.

Enfin, nous avons soigneusement débarrassé de leur moelle ces diaphyses, travail minutieux, mais très important, étant donné la richesse lipidique de la moelle.

Pour les premiers lots de rats, nous avons simplement fait deux extraits : les pattes fracturées, les pattes homologues témoins.

Pour les lots suivants, nous avons divisé la diaphyse fracturée en deux parties :

a) le cal et les extrémités osseuses fracturées ;

b) la partie restante de la diaphyse ;

c) les diaphyses homologues entières servant de témoin comme précédemment.

Pour les chiens, nous avons procédé de la même manière : diaphyse témoin, cal et partie restante de la diaphyse.

Les os ainsi préparés ont été pesés, placés à l'étuve à 37°, 24 à 48 heures.

La perte de poids, assez faible après ce séjour, a été mesurée ; mais surtout nous avons procédé ainsi pour favoriser le broyage ; la pulvérisation est beaucoup plus rapide et de meilleure qualité sur ces os ainsi desséchés. Cette pulvérisation a été pratiquée dans un broyeur à billes.

De la poudre ainsi obtenue, nous avons extrait les lipides par la technique de Folch (72) au méthanol-chloroforme (1 volume de méthanol pour 2 volumes de chloroforme), utilisé dans la proportion de 20 millilitres de solvant pour 1 gramme d'os frais. La poudre et le solvant étaient laissés au contact au moins 48 heures.

La séparation de la poudre d'os et du solvant était réalisée par centrifugation. L'extraction était répétée à 2 reprises par 1 volume de mélange chloroforme-méthanol puis nous lavions avec un volume d'éther.

Les solvants réunis étaient alors évaporés sous vide à basse température. Le résidu sec, repris par le chloroforme, était filtré sur verre fritté G3 pour éliminer les impuretés ; cet extrait chloroformique était alors évaporé et les lipides totaux pesés.

Fractionnement de l'extrait lipidique.

Nous avions commencé à fractionner nos lipides au moyen de la chromatographie sur papier à contre-courant et de la distribution à contre-courant en appareil de Craig suivant la technique décrite par L. Douste-Blazy (56), lorsqu'une nouvelle technique basée sur la chromatographie sur papier imprégné d'acide silicique a été publiée par Polonovski et ses collaborateurs (164).

C'est cette technique que nous avons utilisée, pour l'isolement et le fractionnement des phospholipides de nos extraits et pour le fractionnement des lipides restants.

a) *Chromatographie sur papier.*

Elle a été réalisée suivant la technique mise au point dans le Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté de Toulouse par L. Douste-Blazy, J. Polonovski et P. Valdiguié (57).

La chromatographie sur papier consistant essentiellement en un partage entre une phase aqueuse immobilisée sur une feuille de papier et une phase de solvant organique qui coule sur cette feuille, il peut sembler impossible d'appliquer cette méthode à une classe de composés caractérisés par une très faible affinité pour l'eau.

L'originalité de la méthode proposée consiste en l'utilisation de deux phases organiques mobiles.

La chromatographie est à une dimension et la bande de papier trempé par chacune de ses extrémités dans un mélange de solvants.

Les lipides étant d'une part insolubles dans l'eau et d'autre part très solubles dans les solvants organiques, il semble difficile, à première vue, de les séparer les uns des autres. Cependant les phosphatides à choline sont solubles dans les solvants hydrophiles, tandis que la plupart des lipides migrent avec le front des liquides hydrophobes.

De plus, leur dissolution dans les solvants polaires les opposent aux stérides qui sont plutôt entraînés par les solvants apolaires.

Il existe, en outre, des différences de solubilité entre les principaux groupes de phospholipides.

Grâce à ces différences de solubilité, le mélange de solvants polaires et apolaires non miscibles entre eux, favorise la séparation chromatographique des lipides.

L'utilisation des couples de solvants mis en contact au moins 24 heures avant la chromatographie, dans une ampoule à décantation, permet leur complète saturation.

Parmi les solvants polaires, nous avons utilisé le méthanol et l'acide acétique, comme solvant apolaire l'éther de pétrole, la compo-

sition pouvant varier indéfiniment par addition d'eau, de chloroforme ou d'acétone.

La chromatographie de nos extraits a été pratiquée avec le couple de solvants acide acétique, méthanol, eau - chloroforme, éther de pétrole dans les proportions suivantes : 19 v., 19 v., 1,9 v. - 8 v., 40 v.

La migration est laissée en marche 15 heures à 21° dans une chambre climatisée.

Les chromatogrammes sont colorés au Noir Soudan pour les lipides totaux, à l'acide phosphomolybdique et au chlorure stanneux pour les phospholipides à choline.

Les phospholipides à sérine ou à éthanolamine sont caractérisés par chromatographie de l'insoluble dans l'acétone.

b) *Séparation des phospholipides.*

Nous utilisons pour les séparer leur insolubilité dans l'acétone.

L'extrait sec des lipides totaux est repris par 10 ml d'acétone anhydre et laissé en contact 2 à 3 heures à la chambre froide à — 10°.

La partie insoluble, précipité blanc amorphe, est retenue sur verre fritté G3.

Un nouvel épuisement identique par 10 ml d'acétone est réalisé.

Après une seconde filtration, nous obtenons :

— une solution acétonique qui sera évaporée et qui contient les glycérides et les stérides.

Elle servira au dosage : des esters d'acides gras par la méthode de Jarrier et Polonovski (114) ;

du cholestérol, par la réaction de Liebermann (139).

— un résidu insoluble dans l'acétone qui sera redissous dans le chloroforme. Il est constitué par les phospholipides (fraction minime des phospholipides acétonosolubles exclue).

Par cette technique on isole 90 à 95 % des phospholipides, estimés d'après le phosphore suivant la méthode de Delsal et Manhouri (51).

Pour éliminer les acides aminés qui accompagnent les phosphatides, on les reprend par le chloroforme et on les fait passer dans une colonne de poudre de cellulose suivant la technique de Lea (129).

c) *Fractionnement des phospholipides.*

Nous avons utilisé pour ce fractionnement une colonne d'acide silicique (100 Mesh, Mallinckrodt) de 14 centimètres de haut et de 1 centimètre de diamètre pour fractionner 50 milligrammes de phospholipides.

Cet acide silicique additionné d'hyflo-supercell est activé par chauffage à l'étuve à 110° pendant une nuit et débarrassé des particules les plus fines par plusieurs lavages successifs au méthanol.

La colonne préparée dans le méthanol est lavée successivement par 20 ml d'éther de pétrole, 25 ml de chloroforme-méthanol 4/1 et 25 ml d'éther de pétrole.

Les 50 milligrammes de phospholipides en solution dans 5 ml de chloroforme sont introduits sur la colonne et élués par différents mélanges solvants successifs de chloroforme-méthanol avec des proportions croissantes de méthanol.

On récupère ainsi 90 à 100 % des phospholipides introduits, calculés d'après le phosphore ; l'opération est reproductible.

Nous avons utilisé 3 séries de solvants :

1° Au début de notre étude, nous avons employé la séquence suivante pour l'étude des lipides de l'os normal :

50 ml de chloroforme	portion	1
100 ml de chloroforme-méthanol 4/1	—	2 et 3
100 ml de chloroforme-méthanol 3/2	—	4 et 5
100 ml de chloroforme-méthanol 5/4	—	6 et 7
100 ml de chloroforme-méthanol 1/1	—	8 et 9
100 ml de méthanol	—	10 et 11

Nous recueillons de 50 en 50 ml.

2° Puis pour l'étude des phospholipides au cours des fractures, la série :

	volumes recueillis
1 chloroforme	50 ml
2 chloroforme-méthanol 4/1	100 ml
3 chloroforme-méthanol 3/2	45 ml
4 chloroforme-méthanol 3/2	35 ml
5 chloroforme-méthanol 3/2	15 ml
6 chloroforme-méthanol 3/2-5/4	65 ml
7 chloroforme-méthanol 5/4	40 ml
8 chloroforme-méthanol 1/1	100 ml
9 méthanol	100 ml

3° Enfin, dans un dernier stade, nous avons utilisé successivement :

	volumes recueillis
1 chloroforme	50 ml
2 chloroforme-méthanol 15/1	100 ml
3 chloroforme-méthanol 4/1	100 ml
4 chloroforme-méthanol 3/2	100 ml
5 chloroforme-méthanol 3/2-5/4	100 ml
6 chloroforme-méthanol 5/4	100 ml
7 chloroforme-méthanol 1/1	100 ml
8 méthanol	100 ml

Nous avons recueilli ici des fractions de 10 ml.

d) *Chromatographie sur papier imprégné.*

1) *Préparation du papier :*

La préparation du papier est une opération particulièrement importante qui nous a valu de sérieuses difficultés et de nombreux échecs avant d'obtenir régulièrement des feuilles sans défaut.

La technique utilisée dérive de celle décrite par Lea (129).

Les feuilles de papier Whatman n° 1 sont coupées en deux et chaque moitié est fixée sur un cadre de baguettes de verre. L'ensemble est plongé dans un bain de silicate de sodium (36° Baumé), puis égoutté et plongé dans un bain d'acide chlorhydrique 6 N. L'acide chlorhydrique en excès est éliminé par passage dans une cuve à circulation d'eau courante jusqu'à disparition de l'acidité de l'eau ; un dernier lavage à l'eau distillée est nécessaire. La feuille est ensuite séchée à l'air et passée à l'étuve à 110° pendant 1 heure.

2) *Chromatographie :*

Nous avons choisi le mélange solvant préconisé par Marinetti (143) : di-isobutylcétone-acide acétique-eau (40 vol. - 25 vol. - 5 vol.).

L'extrait lipidique est repris par le mélange chloroforme-méthanol 1/1. La prise d'essai déposée sur la bande de papier Whatman correspond à 4 à 5 gammas de phosphore.

La chromatographie est faite en phase ascendante pendant 20 heures à 22°.

3) *Révélation :*

La feuille séchée est plongée dans une solution aqueuse de Rhodamine 6 G à 0,001 %. Les taches sont observées en lumière ultraviolette. Les acides aminés sont révélés par une solution de ninhydrine à 2 % dans l'acétone et chauffage de quelques minutes à 70°.

METHODES DE DOSAGE

a) Dosages chimiques.

Les solvants de chaque extrait ont été évaporés sous vide jusqu'à ce que le poids de l'extrait sec ne varie plus.

Cet extrait sec a été repris par 5 ml de chloroforme dont on prélève des parties aliquotes pour doser le phosphore, les acides gras estérifiés et le cholestérol.

1. — *Dosage du phosphore.*

Nous avons utilisé la technique de Delsal et Manhouri (51). La prise à essai adéquate, placée dans un tube à essai est évaporée à sec sur un nid chauffant puis reprise par 0,5 ml d'acide sulfurique concentré très pur (acide sulfurique Merck). On chauffe les tubes

jusqu'à début de calcination. Il y a un charbonnement et un dégagement de vapeurs de SO_2. On laisse refroidir et on ajoute une goutte d'eau oxygénée à 110 volumes. On chauffe alors légèrement jusqu'à décoloration. Si les tubes ne se décolorent pas, on recommence l'apport d'une goutte d'eau oxygénée.

Lorsque tous les tubes sont décolorés, on chauffe pendant 4 heures consécutives. Après refroidissement on ajoute dans chacun d'eux 8 ml d'eau distillée, on porte au bain marie bouillant pendant 20 minutes. On ajoute alors une goutte de permanganate N/100 jusqu'à obtention d'une coloration rose pâle. Puis on décolore avec une solution d'oxalate d'ammonium N/100.

Coloration : on introduit 2 ml de molybdate d'ammonium à 5 %, 1 ml d'hydroquinone à 1 % et 1 ml de sulfite de sodium à 20 %. On laisse à l'obscurité pendant 20 minutes et on procède à la lecture sur un photo-colorimètre avec écran jaune-orangé.

Gamme : on utilise une solution mère de phosphate mono-potassique à 0,439 gramme pour 1 litre. Cette solution, diluée au 1/8 et contenant 25 gammas de phosphore par 2 ml sert à réaliser une gamme allant de 6,25 à 75 gammas de P.

2. — *Dosage des acides gras estérifiés.*

Nous avons utilisé la technique décrite par Jarrier et Polonovski (114).

Les acides gras présents dans les milieux naturels sous forme de graisses neutres ou de glycérophospholipides peuvent être dosés grâce à une réaction spécifique qui consiste à les transformer en acides hydroxamiques sous l'influence de l'hydroxylamine, et à en faire un complexe ferrique coloré en rouge violacé.

On utilise les réactifs suivants :

— ClH, NH_2OH en solution à 2,5 % dans l'alcool à 95°, conservée au réfrigérateur ;

— NaOH en solution à 2,5 % dans l'alcool à 95°, conservée au réfrigérateur ;

— une solution stock de perchlorate ferrique obtenue en dissolvant 1,16 gramme de Cl_3Fe dans 20 ml d'eau + 3 ml de NO_3H + 15 ml de ClO_4H, chauffés jusqu'à fumées abondantes ; après refroidissement on ajoute 40 ml d'H_2O, 10 ml de NO_3H et on complète à 100 ml avec ClO_4H ;

— une solution diluée de perchlorate ferrique : 5 ml de solution stock sont dilués à 100 ml avec de l'alcool à 95°. Cette solution ne se conservant pas, est préparée 5 minutes avant usage.

On place la prise à essai adéquate dans un tube à essai. On évapore. Le résidu est dissous dans 0,3 ml d'hydroxylamine alcoolique ; on ajoute 0,3 ml de soude alcoolique. Lorsque la transformation en hydroxamate est terminée après une heure de contact, on ajoute 10 ml de la solution ferrique diluée et les tubes sont maintenus 20 minutes à 25°.

La lecture est ensuite faite au spectrophotomètre (longueur d'onde 520 mμ).

Gamme : on dissout 284 mg de palmitate d'éthyle (soit un milli équivalent d'acide gras) dans 100 ml d'éther. 5 ml de cette solution sont amenés à 50 ml. Cette nouvelle solution est répartie dans des tubes à essai en quantités croissantes de 1 à 6 ml soit 1 m Eq à 6 m Eq. Ces tubes sont traités de la même manière que l'échantillon à analyser.

3. — *Dosage du cholestérol.*

Nous avons utilisé la technique de Lieberman (139). Mais nos extraits lipidiques étant déjà débarrassés de toutes protéines, nous avons directement placé notre prise d'essai, 2 ml de solution chloroformique, dans un tube ; après avoir complété à 5 ml par 3 ml de chloroforme, nous ajoutons 2 ml d'anhydride acétique et 3 gouttes de SO_4H_2 concentré. Après 20 minutes à l'obscurité, nous lisons au photocolorimètre (écran rouge) en nous rapportant à une gamme établie à l'aide d'une solution chloroformique de cholestérol à 0,06 %.

b) Mesure de la radioactivité.

Elle a été réalisée avec une échelle de comptage Tracerlab (SC - 18 A) munie d'un Plug-in ratemeter SC - 40 et d'un compteur Geiger-Muller Tracerlab TG - C2 à paroi de 1,9 MG/CM.

Les échantillons étaient placés sur un SC - 55 Chromatogramme Scanner solidaire d'un SC - 59 Shielded Manual Sample Changer.

La mesure de la radioactivité de la poudre d'os a été effectuée sur 50 mg de poudre sèche étalée dans une cupule à fond plat de 4 cm de diamètre.

La mesure de la radioactivité des phospholipides a été pratiquée en déposant 40 mm^3 de l'extrait repris par 5 ml de chloroforme sur une feuille de papier pour chromatographie et en mesurant la radioactivité de la tache.

c) Autoradiogrammes.

Nous avons pratiqué sur papier imprégné d'acide silicique une chromatographie des extraits phospholipidiques des différents lots obtenus chez nos deux chiens ayant reçu l'injection de phosphore radioactif, suivant la technique précédemment décrite.

Nous avons déposé un volume de solution chloroformique correspondant à 6 mg de phospholipides par tache.

Après chromatographie, les autoradiogrammes ont été pratiqués avec des films radiographiques Kodak sans écran à double face et laissés en contact pendant 10 jours avant développement.

II. - RÉSULTATS

A) LES LIPIDES DE L'OS NORMAL

A) Lipides totaux.

L'isolement et le fractionnement de l'extrait lipidique total osseux nous ont permis d'obtenir un certain nombre de résultats.

Pour juger et comparer ces différents résultats, nous avons indiqué les quantités de lipides totaux, de phospholipides et de cholestérol obtenues pour 100 grammes d'os frais d'une part, et les taux de phospholipides et de cholestérol pour 100 grammes de lipides totaux d'autre part.

Nous groupons nos principaux résultats dans le tableau suivant :

Tableau N° VIII

Composition lipidique des os longs du rat et du chien

	Lipides totaux % de tissu frais	Phospholipides		Cholestérol	
		% de tissu frais	% de lipides	% de tissu frais	% de Lipides
Rats :					
lot n° 1 ..	0,52	0,098	18,88	0,023	4,4
lot n° 2 ..	0,40	0,070	17,03	0,018	4,5
lot n° 3 ..	1,90	0,178	9,32	0,10	5,2
lot n° 4 ..	1,71	0,232	13,55	0,078	4,5
moyenne ..	1,13	0,144	14,69	0,054	4,65
Chien	1,20	0,11	9,16	0,055	4,5

Les valeurs que nous avons obtenues pour les rats sont assez variables entre les différents lots analysés. Ces différences semblent se rapprocher des variations individuelles non négligeables que Roche et Mourgue (181-182) ainsi que Dallemagne (50) ont notées dans l'étude de la composition minérale des os du rat.

La valeur moyenne des lipides totaux est de 1 gramme à 1,2 gramme pour 100 grammes d'os frais dans les deux espèces animales étudiées.

Les phospholipides représentent 14 % des lipides totaux chez le rat, un peu moins, 9 %, chez le chien ; le pourcentage du cholestérol se situe à 4,5 % dans les deux espèces.

Ces valeurs montrent des différences notables avec les chiffres donnés par Spector (201) sur la teneur en lipides des fémurs de rat (5 à 7 % d'os frais) et de chien (13 % d'os frais). Ils diffèrent également des chiffres donnés par Leach (130) qui trouve dans l'os compact de bœuf des taux de 2 à 3 % de phospholipides pour 100 grammes

de lipides et de 15 % pour le cholestérol total. Des variations individuelles et des variations suivant les espèces peuvent être en cause.

B) Fractions lipidiques.

La chromatographie sur papier des extraits lipidiques totaux par deux solvants non miscibles nous a permis de séparer plusieurs fractions ; toutes sont colorées par le Noir Soudan, certaines par l'acide phosphomolybdique et le chlorure stanneux.

a) L'extrait lipidique total est d'abord subdivisé en deux parties :

— l'une entraînée par la phase légère (éther de pétrole - chloroforme) qui peut être constituée par des glycérides, des stérides ou des céphalines ;

— l'autre migrant avec la phase lourde (acide acétique - méthanol - eau) qui représente des lécithines ou des sphyngomyélines. Seule cette deuxième fraction est colorée par l'acide phosphomolybdique et le chlorure stanneux.

b) L'extrait acétonique révèle une seule tache qui est éthérosoluble et qui est formée de glycérides et de stérides.

c) Pour les lipides insolubles dans l'acétone (phospholipides) la chromatographie sur papier, méthode de Marinetti (143), révèle la présence de céphalines, entraînées par la phase légère et de phospholipides à choline (lécithines ou sphingomyélines) migrant avec la phase lourde.

Ces divers chromatogrammes, photographiés ci-dessous, permettent de caractériser dans les lipides de l'os :

— des glycérides,
— des stérides,
— des céphalines,
— des phospholipides à choline.

C) Phospholipides.

1. — Après avoir fractionné les phospholipides sur colonne silicique suivant la technique que nous avons décrite (58), et recueilli 50 ml de chacun des mélanges solvants utilisés, nous avons précisé la nature de chaque fraction en dosant sa teneur en phosphore et en esters d'acide gras.

Dosage du pohsphore.

La moyenne de nos mesures sur les différents lots étudiés donne les chiffres suivants :

portion 1	pas de phosphore,
portion 2 et 3	20 % du phosphore total,
portion 4 et 5	pas de phosphore,
portion 6	13 % du phosphore total,
portion 7	pas de phosphore,
portion 8 - 9 - 10	67 % du phosphore total.

Nous avons reporté les résultats de ces dosages sur le graphique n° 1 (numéros des portions d'éluat en abcisse et pourcentages de phosphore en ordonnée). Nous obtenons 3 pics phosphorés.

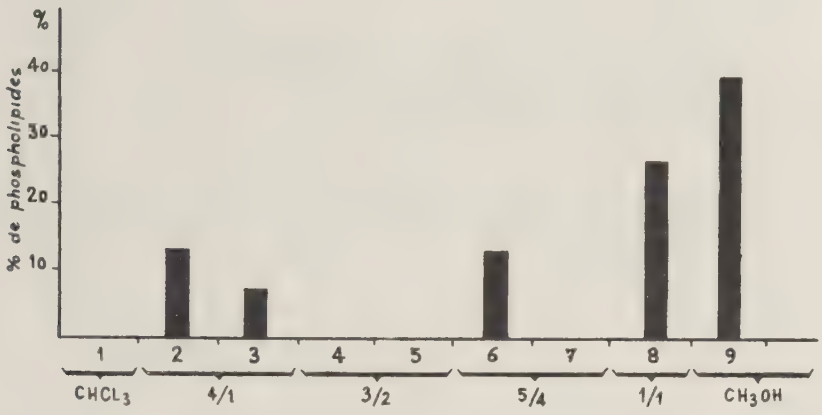


Figure n° 2. — Pourcentage en phosphore des différentes fractions des phospholipides.

La première portion renferme quelques lipides non phosphorés qui peuvent rester dans l'extrait acétono-insoluble.

Les esters d'acides gras ont été dosés dans chacune des dix fractions.

En comparant ces valeurs d'esters d'acides gras aux pourcentages d'acide phosphorique précédemment dosés nous obtenons :

— Dans la 2e et la 3e fraction un rapport $\frac{\text{esters d'acide gras}}{\text{phosphore}}$ légèrement supérieur à 2.

— Dans la fraction 6, un rapport égal à 2.

— Dans la dernière fraction un rapport inférieur à 2.

Ces valeurs du rapport laissent présumer la présence de phospholipides dans ces diverses fractions :

— Céphalines dans les fractions 2 et 3. James (113) a en effet signalé récemment un rapport supérieur à 2 dans les céphalines ;

— Lécithines dans la fraction 6 ;

— Lysocithines ou sphingomyélines dans la dernière fraction. Ces phospho-amino-lipides abaissent en effet la valeur du rapport $\frac{\text{esters d'acide gras}}{\text{phosphore}}$.

2. — Nous avons chromatographié sur papier imprégné d'acide silicique chacune des fractions de l'éluat (cliché n° 2) au moyen de di-iso-butyl-cétone, acide acétique, eau (40 - 25 - 5 ml).

Le mélange chloroforme - méthanol 4/1 (fractions 2 et 3) laisse un lipide au point de départ (Rf = 0) et en entraîne deux autres :

L'un de Rf = 0,15 en cours d'identification (probablement inositol-phosphatide ou acide phosphatidique).

L'autre de Rf = 0,62 céphalines.

Le Rf 0 est peut-être celui d'un glucolipide.

Le mélange 3/2 5/4 (fraction 6) entraîne trois phospholipides.

Rf = 0,18 - Rf = 0,23 non identifiés (inositol phosphatides ou lipopeptides.

Rf = 0,45 lécithines.

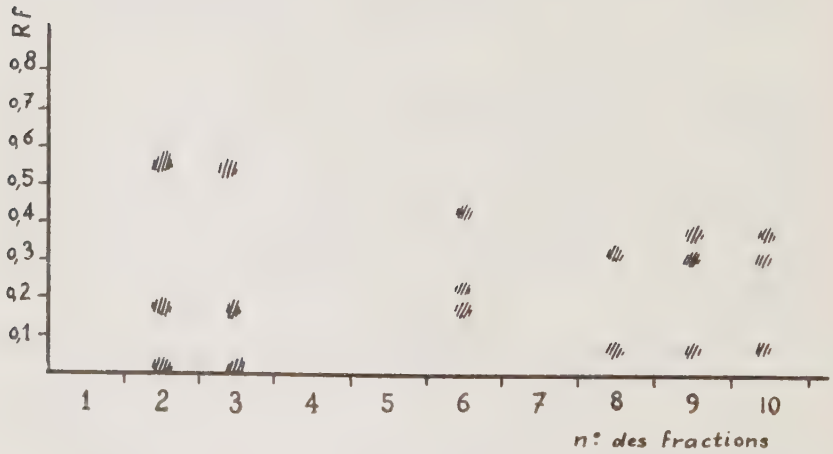


Figure n° 3. — Chromatographie des diverses fractions de l'extrait phospholipidique.

Le mélange 1/1 et le méthanol (fractions 8 à 10) entraînent trois taches :

Rf = 0,05 non identifiée (peut-être inositol phosphatide),
Rf = 0,30 lysocithine,
Rf = 0,36 sphingomyéline.

Ce dernier groupe phospholipidique est le plus complexe et le plus difficile à identifier. Il renferme une faible quantité de sphingomyéline et de lysocithine ainsi qu'une certaine quantité d'un lipide peu entraînable par la di-isobutylcétone et non encore identifié.

B) LES LIPIDES DE L'OS FRACTURE

Les résultats que nous allons exposer montrent qu'une fracture entraîne chez l'animal une élévation du taux des lipides osseux.

Cette augmentation intéresse tout le squelette car elle est perçue, bien qu'à des degrés différents, aussi bien dans l'os fracturé que dans l'os de la patte symétrique.

La réponse au stress que constitue la fracture met en cause les lipides de l'os.

L'accroissement des lipides osseux pose un certain nombre de problèmes métaboliques jusqu'ici méconnus. Pour essayer d'y répondre, nous considèrerons :

— l'augmentation lipidique totale,

— ses variations avec les individus et l'espèce,

— ses variations dans les diverses parties de l'os et du système osseux,

— ses variations avec le temps.

Nous aurons à envisager les mêmes questions à propos des fractions lipidiques que nous avons séparées, fraction des phosphatides et fraction des stérides.

I. Etude de l'extrait lipidique total.

1. — *Chez le rat.*

Nous avons sacrifié les divers lots d'animaux porteurs de fracture après des temps de consolidation variables : 10 jours, 20 jours, 1 mois, 2 mois.

Tous nos résultats consignés dans les tableaux IX et X montrent une élévation des lipides totaux après fracture.

Deux points méritaient attention :

1° L'évolution des lipides osseux dans la période de réparation ;

2° La répartition des lipides dans le cal et les autres parties du squelette.

1° *Evolution des lipides dans la période de réparation.*

Elle se manifeste par les valeurs indiquées dans le tableau IX.

TABLEAU N° IX

Lipides des os longs du rat au cours de l'évolution des fractures

Résultats exprimés en grammes de lipides pour 100 g de tissu frais et en grammes de phospholipides et de cholestérol pour 100 g de lipides totaux.

	Lipides	Phospholipides		Cholestérol	
	totaux % os frais	% os frais	% lipides totaux	% os frais	% lipides totaux
10 jours					
Patte gauche fracturée	2,285	0,405	17,72	0,094	4,11
Patte droite	2,637	0,347	13,15	0,071	2,69
20 jours					
Patte gauche fracturée	1,893	0,270	14,21	0,050	2,63
Patte droite	2,175	0,284	13,05	0,074	3,40
30 jours					
Patte gauche fracturée	4,495	0,310	6,92	0,127	2,82
Patte droite	2,993	0,270	8,35	0,081	2,70
1 mois					
Patte gauche fracturée	3,910	0,727	18,59	0,090	2,30
Patte droite	2,782	0,852	30,62	0,175	6,28
1 mois					
Patte gauche fracturée	3,100	0,310	10	0,057	1,83
Patte droite	2,090	0,507	24,25	0,084	4,01
2 mois					
Patte gauche fracturée	4,603	0,526	11,42	0,078	1,69
Patte droite	2,894	0,233	8,06	0,104	3,59

Ce tableau montre une augmentation lipidique générale pendant la consolidation de la fracture.

Dès le 10e jour qui suit celle-ci, l'élévation est appréciable dans tous les os étudiés, fracturés ou non.

Après 10 et 20 jours, l'augmentation est plus nette au niveau des pattes témoins qu'au niveau des os fracturés.

Puis brusquement, le taux des lipides de ces derniers augmente, atteignant au bout d'un mois d'évolution, un chiffre double des valeurs du 10e jour.

Par contre, le taux lipidique de la patte opposée reste accru, sans nouvelles modifications.

Après 1 et 2 mois, l'élévation reste notable dans les os en voie de consolidation et encore supérieure à celle des os témoins : 3,9 et 4,6 % au lieu de valeurs inférieures à 3 %.

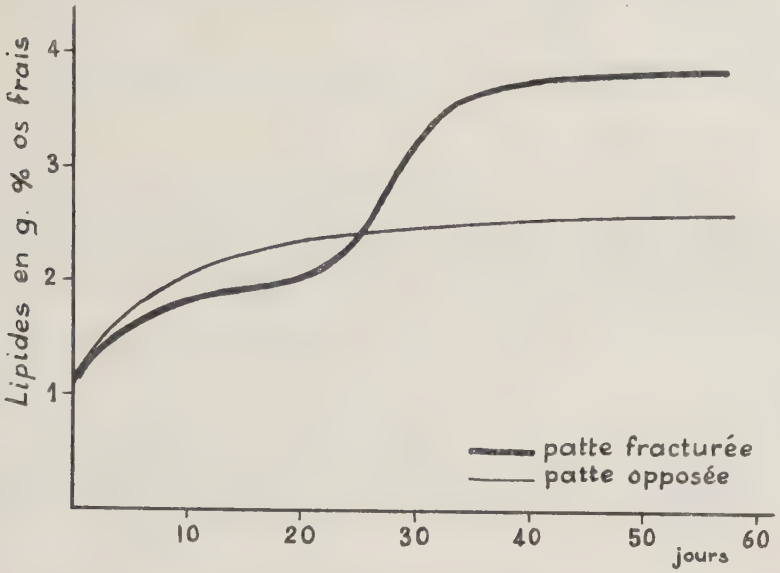


Figure n° 4. — Variation du taux des lipides en fonction du temps.

2° *Variations des lipides totaux dans les diverses parties de l'os fracturé.*

L'enrichissement en lipides de l'os fracturé se fait-il d'une façon homogène ou inégalement comme la calcification ?

Pour répondre à cette question, il faut considérer nos dosages portant :

— sur le cal,
— sur le reste de la diaphyse,
— sur la patte témoin,

de nos divers lots de rats d'expérience.

TABLEAU N° X

Teneur en lipides des os longs de rat fracturés depuis 10 jours

	Lipides totaux % os frais	Phospholipides		Cholestérol	
		% d'os frais	% de lipides	% d'os frais	% de lipides
Cal	5,79	1,18	20,37	0,09	1,55
Reste de la diaphyse	2,89	0,52	17,99	0,07	2,42
Patte opposée.	1,0	0,22	22,70	0,05	5,60

Le tableau X révèle que, dès le 10e jour après la fracture, l'élévation des lipides totaux est importante : l'extrait lipidique est de 2,89 % dans les diaphyses des pattes fracturées, de 5,79 dans les cals eux-mêmes, la moyenne lipidique des os de rats normaux étant de 1,13 (tableau n° VIII).

Ainsi l'augmentation des lipides totaux porte surtout sur le cal.

2. — *Chez le chien.*

Nous indiquons sur les tableaux qui vont suivre, la répartition lipidique dans les diverses parties de l'os à des phases différentes de la consolidation.

Nous retrouvons la même augmentation importante du taux des lipides osseux sur le squelette dans son ensemble, mais surtout au niveau des os fracturés.

Nos expériences révèlent encore une évolution du taux lipidique en fonction du temps et l'influence des conditions de traitement de la fracture.

Le premier chien a été sacrifié 15 jours après la fracture.

Nous observons une augmentation nette des lipides totaux (tableau n° XI) qui, de 3,28 % de l'os frais au niveau des os intacts, atteignent 7 % dans les parties de la diaphyse fracturée voisines du cal.

Tableau N° XI

Teneur en lipides des os longs du chien 15 jours après fracture

	lipides totaux % de tissu frais	Phospholipides		Cholestérol	
		% de tissu frais	% de lipides	% de tissu frais	% de lipides
Pattes témoins	3,28	0,28	8,63	0,22	0,65
Patte avant cal	4,31	0,22	5,17	0,32	0,74
Patte avant diaphyse	6,74	0,41	6,08	0,55	0,82
Patte arrière (fracture vissée) cal	5,15	0,42	8,25	0,45	0,87
Patte arrière diaphyse	7,01	0,47	5,60	0,31	0,45

Il faut noter que après 15 jours d'évolution, la réparation de la fracture du chien est beaucoup moins avancée que celle du rat.

La patte antérieure où le cal est en pleine évolution et commence seulement à se minéraliser possède un taux de lipides augmenté de 50 % par rapport aux autres pièces squelettiques.

La patte postérieure de ce même chien a été fracturée et une vis a été placée. Cette ostéosynthèse provoque l'accumulation d'une plus grande quantité de lipides totaux dans le cal : 5,15 g au lieu de 4,31 % dans le cal spontané et de 3,28 dans l'os témoin.

Pour les chiens sacrifiés au bout de 5 semaines, les résultats obtenus sont très différents. Les lipides totaux sont plus faibles que 15 jours après la fracture (tableau n° XII).

TABLEAU N° XII

Teneur en lipides des os longs de chien, 35 jours après fracture

	Lipides totaux	Phospholipides		Cholestérol	
	% de tissu frais	% de tissu frais	% de lipides	% de tissu frais	% de lipides
Pattes témoins	4,16	0,21	5,04	0,02	0,48
Patte avant fracturée cal.	3,23	0,35	10,83	0,05	1,54
Patte avant fracturée diaphyse	3,65	0,19	5,20	0,03	0,82
Patte arrière fracturée vissée - cal	2,32	0,45	19,39	0,03	1,29
Patte arrière fracturée diaphyse	6,24	0,51	8,17	0,05	0,80

Par ordre de pourcentage lipidique décroissant, nous trouvons :

diaphyse d'os fracturé vissé 6,24
patte témoin 4,16
diaphyse d'os fracturé plâtré 3,65
cal sous plâtre seul 3,13
cal vissé 2,32

Nous pouvons noter d'après ces résultats que les cals ont perdu la richesse lipidique qu'ils manifestaient deux semaines après la fracture.

Les diaphyses des os fracturés sont elles-mêmes encore chargées de lipides sauf dans le cas d'ostéosynthèse.

Nous trouvons donc un changement notable sans doute en rapport avec la phase de calcification de la fracture.

Cette évolution lipidique est différente de celle que nous avions observée chez le rat. La plus grande vitesse de consolidation des os de celui-ci peut expliquer cette différence.

Dans le cas de pseudarthrose, nous observons une différence au niveau de la patte fracturée : la diaphyse contient moins de lipides que le foyer de pseudarthrose. (Tableau N° XIII.)

TABLEAU N° XIII

Teneur en lipides des os longs de chien, 35 jours après fracture Pseudarthrose

	Lipides totaux % de tissu frais	Phospholipides		Cholestérol	
		% de tissu frais	% de lipides	% de tissu frais	% de lipides
Pattes témoins	2,01	0,18	8,95	0,02	0,99
Patte avant fracturée cal.	2,33	0,29	12,44	0,04	1,71
Patte avant fracturée diaphyse	4,36	0,31	7,11	0,03	0,68
Patte arrière vissée pseudarthrose	2,94	0,34	11,56	0,02	0,68
Patte arrière vissée diaphyse	2,38	0,23	9,66	0,05	2,10

Tout se passe comme si, au moment de l'installation de la pseudarthrose, le métabolisme lipidique osseux était dévié. Au début de la réparation osseuse, dans les quinze premiers jours, on observe une augmentation des lipides totaux, portant essentiellement sur les glycérides et stérides. Puis le cal ne se formant pas puisque l'évolution de la fracture se fait vers la pseudarthrose, le métabolisme lipidique osseux est ralenti, les lipides sont remaniés et diminuent.

Alors que la diaphyse de la fracture simple de la patte antérieure est encore riche en lipides, 4,36 %, la diaphyse avec pseudarthrose n'a plus que 2,38 % de lipides. Les extrémités non soudées de la diaphyse ont un taux lipidique de 2,94 alors que le cal en voie d'ossification n'a plus que 2,33.

Il aurait été intéressant de suivre cette évolution au bout de plusieurs mois.

II. Etude des fractions lipidiques : phosphatides et stérides.

Nos résultats montrent que les modifications de lipides totaux que nous venons de décrire se retrouvent pour les phospholipides et à un degré moindre et parfois inversé pour les stérides.

Nous envisageons encore les variations de ces fractions :

1° dans le temps,

2° dans les diverses parties du squelette.

1° Variations avec le temps.

Phospholipides.

Dans les trois premières semaines, le rapport des phospholipides aux lipides totaux est plus élevé dans la patte fracturée que dans la patte opposée.

Au moment où la fracture consolide, un brusque mouvement de bascule se produit et les phospholipides sont alors moins abondants au niveau de la patte fracturée. Il semble qu'on revienne ensuite à l'état initial avec un relèvement du taux des phospholipides dans les os fracturés (tableau VIII).

Pour préciser cette évolution des phospholipides au cours de la consolidation des fractures ,nous avons fractionné sur colonne d'acide silicique les phospholipides des extraits d'os obtenus 10 jours, 20 jours et 30 jours après la fracture. Nous avons recueilli pour chaque extrait 9 fractions représentant les divers mélanges solvants utilisés, et dosé le phosphore sur chaque fraction.

Tableau N° XIV

Teneur en phosphore des différentes fractions de phospholipides après fractionnement

	Fraction	Patte droite		Patte gauche fracturée	
		Phosphore		Phosphore	
		en gammas	en %	en gammas	en %
Après 10 jours	1	0	0	0	0
	2	300	41	250	36
	3	57	7,8	56	8
	4	0	0	85	12
	5	32	4,2	0	0
	6	36	5	12	2
	7	3	0	14	2
	8	70	9,5	65	10
	9	225	31,5	200	30
Après 20 jours	1	0	0	0	0
	2	41	43	80	39
	3	11,5	12	14	7
	4	6	6	9,5	4,5
	5	0	0	0	0
	6	13	13,5	25	12
	7	0	0	14,5	7
	8	0	0	2	0
	9	25	26	60	30
Après 30 jours	1	0	0	0	0
	2	6,5	8	56	10
	3	15,5	22	93	17
	4	15,5	22	28	5
	5	0	0	0	0
	6	6	6	19	4
	7	0	0	11	2
	8	13,5	20	110	20
	9	16	22	235	43

Nous avons reporté les chiffres de ce tableau sur trois graphiques avec en abcisse les fractions de solvants et en ordonnée les pourcentages de phosphore exprimés en grammes pour 100.

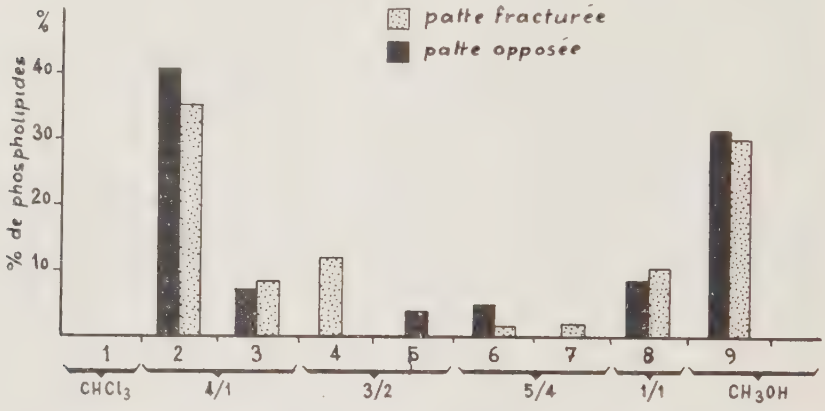


Figure n° 5. – Pourcentage en gammas de phosphore des diverses fractions de la chromatographie.

Fracture datant de 10 jours.

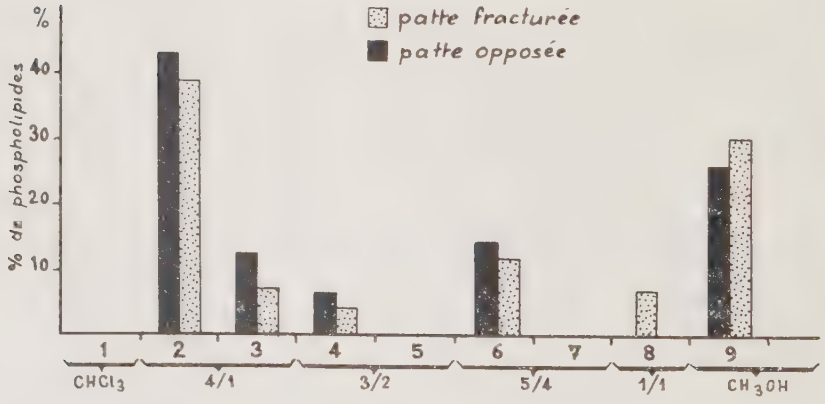


Figure n° 6. — Pourcentage en gammas de phosphore des diverses fractions de la chromatographie.

Fracture datant de 20 jours.

La comparaison de ces graphiques avec celui d'un os normal nous permet d'apprécier les modifications qualitatives des phospholipides au cours de l'évolution des fractures.

Le 10e jour, on trouve dans les 2 pattes, un clocher de phosphore très important dans la deuxième fraction qui persiste avec une inten-

sité moindre dans la troisième. Les phospholipides de ces fractions obtenues avec chloroforme méthanol 4/1, sont des céphalines.

Nouveau clocher, lécithinique cette fois, dans les fractions 5 et 6 (chloroforme-méthanol 3/2), puis dans les fractions 8 (chloroforme-méthanol 1/1) et 9 (méthanol) qui correspondent aux sphingomyélines et aux lysocithines.

Le 20e jour, les courbes n'ont pas changé sensiblement. Mentionnons seulement une diminution de la quantité du phosphore céphalinique de la fraction 2 (avec un pourcentage inchangé) et une faible augmentation du pourcentage lécithinique.

Par contre, le 30e jour, nous nous rapprochons de l'état de l'os normal. Le phosphore céphalinique des 2e et 3e fractions diminue nettement avec un étalement plus marqué du clocher vers la fraction 4.

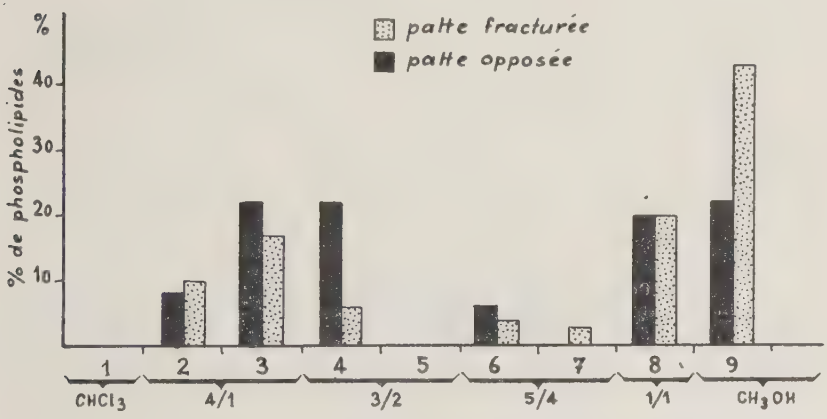


Figure n° 7. — Pourcentage en gammas de phosphore des diverses fractions de la chromatographie.

Fracture datant de 1 mois.

Les lécithines disparaissent presque complètement et une montée brutale du phosphore des 8e et 9e fractions indique un fort accroissement des lysocithines et des sphingomyélines.

Ces modifications se retrouvent d'une manière assez parallèle au niveau de la patte fracturée et de la patte opposée.

Il faut signaler aussi, par rapport à l'os normal, une tendance à l'étalement du phosphore dans les diverses fractions.

Mais l'examen de ces courbes ne peut donner qu'une idée générale. En effet, il n'est pas possible de déterminer exactement les causes de cet étalement. De même, on ne peut pas dire quel est le phospholipide en cause dans la brusque élévation du phosphore de la 9e fraction chez le rat fracturé depuis 1 mois.

Nous pourrons cependant trouver dans cette élévation une confirmation des travaux de Weidman (213) sur le rôle calcifiant des sphingomyélines et attribuer à celle-ci la brusque élévation phospholipidique au moment de la calcification du cal.

Nous essayerons d'apporter un complément de réponse à ces questions par les chromatographies des extraits phospholipidiques fractionnés dont nous rapportons plus loin les résultats.

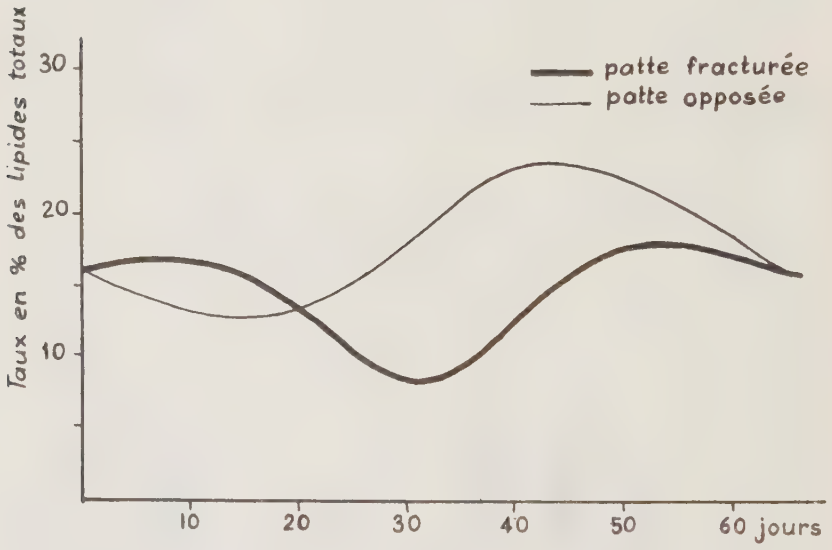


Figure n° 8. — Variation des phospholipides en fonction du temps.

Stérides.

Le cholestérol est un peu augmenté dans tout le squelette après fracture. Il s'abaisse au 20e jour dans l'os fracturé, au moment de la prise du cal, pour remonter ensuite très légèrement.

2° Variations dans les diverses parties de l'os.

Chez le rat.

Phospholipides.

En comparant les concentrations des phosphatides et des stérides dans les diverses parties des os fracturés et dans les os témoins (tableau X), nous observons une augmentation de ces composés dans la diaphyse et dans le cal.

Mais ces variations sont inégales.

De 0,22 % dans les pattes témoins, le pourcentage phospholipidique passe à 0,52 dans la diaphyse et à 1,18 dans le cal.

Ces variations sont assez parallèles à celles des lipides totaux (figure n° 4) qui s'accroissent cependant davantage.

Les pourcentages d'augmentation sont pour les lipides totaux, de 189 pour la diaphyse et de 479 pour le cal. Les phospholipides s'élèvent de 145 % dans la première et de 436 % dans le second.

Stérides.

Les stérides augmentent dans tout le squelette après la fracture. Mais l'accroissement de la patte témoin est dépassé par celui de la diaphyse de l'os fracturé et surtout par celui du cal.

L'élévation des stérides est, elle aussi, moins importante que celle des lipides totaux. Le rapport cholestérol/lipides totaux diminue de la patte témoin à la diaphyse fracturée et au cal.

Les rapports phospholipides/lipides totaux et stérides/lipides totaux tendent à diminuer pendant l'évolution des fractures.

L'accroissement d'autres fractions lipidiques, glycérides en particulier, paraît donc en cause.

Chez le chien.

Phospholipides.

L'animal sacrifié 15 jours après la fracture, a des phospholipides inchangés ou abaissés dans le cal, 0,22 % d'os frais au lieu de 0,28 dans la patte témoin.

Par contre, le reste de la diaphyse a 0,41 % de phospholipides, soit une augmentation de 46 % sur la patte témoin.

L'os fracturé et maintenu par ostéosynthèse a une proportion de phospholipides accrue à la fois dans le cal (0,42 %, au lieu de 0,22 dans le cal spontané) et dans la diaphyse (0,47 au lieu de 0,41 % de tissu frais).

Le cholestérol total est augmenté légèrement dans la patte simplement plâtrée (cal et diaphyse) et dans le cal d'ostéosynthèse.

Pour les chiens sacrifiés au bout de 5 semaines, nous observons une élévation notable des phospholipides dans les cals (spontanés ou vissés) et une élévation moindre dans les diaphyses correspondantes.

Dans le cas de la pseudarthrose, nous ne trouvons qu'une augmentation minime des phospholipides dans les extrémités des fragments diaphysaires non soudés et dans le reste de la diaphyse.

III. **Chromatographies.**

Avec la technique décrite plus haut, sur papier imprégné d'acide silicique, nous avons réalisé la chromatographie d'extraits lipidiques totaux d'os de rats et de chiens, de phospholipides séparés par leur insolubilité dans l'acétone et de produits du fractionnement phospholipidique sur colonne d'acide silicique.

Nous avons ainsi à envisager les chromatogrammes :

A) d'extraits lipidiques totaux ;

B) de phospholipides ;

C) de fractions phospholipidiques.

Ils proviennent :

d'os témoin, patte opposée à la patte fracturée ;
d'os fracturé (diaphyse entière avec cal, en particulier chez le rat) ;
de cals seuls ;
de diaphyse restant après prélèvement du cal.

A) Extraits lipidiques totaux.

Nous avons obtenu les résultats suivants :

Par rapport aux migrations des extraits d'os témoin :

a) les extraits d'os fracturés entiers (cal+portion restante de la diaphyse) révèlent :

— une augmentation des céphalines,
des acides phosphatidiques,
des sphingomyélines,
des triglycérides.

Nous ne mentionnons pas les constituants qui paraissent inchangés.

b) Les chromatogrammes de cals montrent :

— une diminution des céphalines,
des acides phosphatidiques,
des inositolphosphatides,

une augmentation des lysocithines,
des triglycérides,
des diglycérides.

c) Les diaphyses restantes séparées du cal mettent en évidence :

— une augmentation globale des phospholipides et plus particulièrement :
des acides phosphatidiques,
des céphalines,
des inositolphosphatides.

B) Phospholipides.

Leur chromatographie confirme les résultats précédents.

Nous ferons seulement mention des résultats obtenus :

— avec les cals,
— avec les extrémités diaphysaires des pseudarthroses,
— avec les cals d'ostéosynthèse.

1 2 3

Chromatographie n° 1. — Solution chloroformique de phospholipides totaux.
1 : Diaphyse. — 2 : Cal. — 3 : Os témoin.

1 2 3 4 5 6 7 8

Chromatographie n° 2. — Diaphyse fracturée.
Phospholipides totaux fractionnés sur acide silicique.

1 2 3 4 5 6 7 8

Chromatographie n° 3. — Cal.

Phospholipides totaux fractionnés sur acide silicique.

Chromatogrammes de cals spontanés.

Nous retrouvons les variations décelées avec les extraits totaux :

diminution des céphalines,
des inositolphosphatides,
des lysocithines,

augmentation des triglycérides.

Mais, en outre, pour les cals de rats, la tache de lipides non entraînés par le système solvant di-isobutylcétone - acide acétique - eau est moins marquée que celle de la diaphyse ou de l'os témoin. Ce sont surtout des glycolipides qui doivent constituer cette fraction insoluble. Ils seraient moins abondants dans le cal en formation.

Chromatogrammes d'extrémités diaphysaires non soudées par pseudarthrose.

Leurs caractères majeurs sont, par rapport aux cals spontanés de fractures simples :

diminution des triglycérides et des diglycérides,
des lécithines,
des sphingomyélines,

augmentation des céphalines,
des glycolipides restant à l'origine,
des stérides, observés sur les chromatogrammes d'extrait lipidique total.

Chromatogrammes de cals d'ostéosynthèse.

Leurs caractères sont intermédiaires entre ceux de cals spontanés de fracture simple et ceux de pseudarthroses :

diminution globale des phospholipides,

augmentation des stérides.

Variations avec le temps. — Les diaphyses se sont, au bout d'un mois, appauvries en lécithine et en sphingomyéline.

Les cals de fractures simples, sans ostéosynthèse, donnent, après 30 jours d'évolution, un chromatogramme assez voisin de celui de l'os normal.

C) Fractions phospholipidiques.

Les résultats obtenus n'apportent pas de complément à ce que nous venons de décrire, mais un fait nouveau mérite attention :

Les lipides des parties de l'os fracturé ont une solubilité modifiée dans les mélanges chloroforme-méthanol.

Les lécithines des diaphyses restant après enlèvement du cal passent entièrement dans la fraction 4 (chloroforme-méthanol 3/2).

Les lécithines et sphingomyélines des cals sont encore présentes dans les fractions 5, 6 et 7 comme si leur solubilité diminuait vis-à-vis du chloroforme et augmentait dans le méthanol.

1 2 3 4 5 6 7 8

Chromatographie n° 4. — Os témoin.
Phospholipides totaux fractionnés sur acide silicique.

IV. Etude de l'incorporation du phosphore radioactif.

Nous avons mesuré la radioactivité de la poudre d'os des différents lots étudiés chez nos chiens ayant reçu une injection sous-cutanée de Phosphate disodique contenant 2 microcuries de P_{32}.

Pour 50 mg de poudre, nous avons obtenu les résultats suivants :

Tableau N° XV

Radioactivité en coups-minute de la poudre d'os

Nos des essais	O S	Temps après l'injection	
		12 h.	24 h.
1	Pattes témoins	585	3.183
2	Patte arrière cal fracture vissée	7.538	—
3	Patte arrière extrémité des fragments - pseudarthrose	—	26.631
4	Patte arrière - diaphyse	1.785	13.182
5	Patte avant - fracture simple - cal ..	10.561	12.350
6	Patte avant - diaphyse	2.774	6.329

On constate des chiffres un peu plus élevés 24 heures après l'injection. Il faut noter le chiffre important relevé au niveau de la pseudarthrose en pleine évolution (26.631).

Cette radioactivité est due en grande partie à la pénétration du P 32 dans l'os sous forme minérale.

Il était donc nécessaire, pour juger de la radioactivité lipidique d'obtenir un extrait de phospholipides osseux.

Nous avons séparé les phospholipides de l'extrait total par précipitation acétonique suivant la méthode indiquée et nous avons mesuré la radioactivité de la solution chloroformique de cet extrait : elle est exprimée en coups/minute dans le tableau suivant :

Tableau N° XVI

Radioactivité en coups-minute des extraits lipidiques

Nos des essais	O S	Prélèvement 12 h. après l'injection		Prélèvement 24 h. après l'injection	
		Coups/ minute	pour 1 g de phospho-lipides	Coups/ minute	pour 1 g de phospho-lipides
1	Pattes témoins	400	2.760	786	6.288
2	Patte arrière - fracture vissée - cal	1.550	17.825	—	—
3	Patte arrière extrémité des fragments pseudarthrose	—	—	4,250	72.250
4	Patte arrière - diaphyse	1.000	15.400	3.250	67.400
5	Patte avant - fracture simple - cal	1.300	22.100	1.713	26.550
6	Patte avant - diaphyse	250	12.500	1.259	21.400

Les pourcentages d'augmentation soit :	12 h.	24 h.
2 patte arrière - vissée -	545	
3 patte arrière - pseudarthrose		1 049
4 patte arrière - diaphyse	457	971
5 patte avant - cal	700	322
6 patte avant - diaphyse	352	243

Nous voyons que rapportée à 1 gramme de phospholipides, la radioactivité de nos extraits est beaucoup plus importante au niveau des pattes fracturées qu'au niveau du reste du squelette, 16 956 coups-minute en moyenne au lieu de 2 760. La pseudarthrose a ici aussi, un taux nettement plus élevé.

La présence du phosphore radioactif doit nous permettre de juger la concentration des phospholipides, la rapidité de leur formation et par conséquent leur rôle dans les diverses parties de l'os fracturé.

La radioactivité la plus faible chez nos deux chiens, est celle de la diaphyse de la patte avant, de part et d'autre d'un cal en évolution depuis 5 semaines. Nous pouvons penser que la phase métabolique la plus active, dans lesquelles ces lécithines agissent, était déjà en partie dépassée. Cependant, l'augmentation de radioactivité par rapport à l'os témoin est encore de 352 et 243 %.

La diaphyse des pattes postérieures est plus riche en P_{32} ; le nombre des coups-minute dépasse celui de l'os témoin de 457 % (autour d'un cal vissé) et de 971 % (de part et d'autre d'une pseudarthrose).

Dans les cals spontanés des pattes antérieures, nous trouvons 322 % et 700 % d'accroissement de la radioactivité. Nous pensons qu'ici encore, cette valeur apporte une preuve certaine de la participation des phospholipides à la formation du cal.

Pourquoi une variation du simple au double entre les deux chiens ? Sans doute la consolidation plus avancée dans un cas diminue-t-elle la présence lipidique.

Restent enfin le cal vissé et la pseudarthrose.

Le cal vissé a une richesse en P_{32} très supérieure à celle de la patte témoin, 545 % d'augmentation. Cet accroissement est un peu inférieur à celui du cal spontané.

Le vissage du cal et la présence d'un corps étranger peuvent apporter une certaine modification au processus de réparation et diminuer légèrement la richesse phospholipidique.

La pseudarthrose a la plus grande concentration en P_{32} phospholipidique (1 049 % d'augmentation par rapport à la patte témoin). Cela montre que les phospholipides doivent avoir un rôle important dans les premières phases d'évolution des fractures, cette première phase persistant longtemps si la formation du cal ne peut pas se réaliser.

Il était enfin intéressant de comparer la radioactivité globale de l'os à cette radioactivité des phospholipides. Celle-ci exprimée

en % de l'activité de la poudre correspondante est exprimée dans le tableau suivant :

TABLEAU N° XVII

Rapport des radioactivités $\frac{os\ total}{lipides}$

Nos des essais		Prélèvement 12 h. après l'injection	Prélèvement 24 h. après l'injection
1	Patte témoin	0,0198	0,0183
2	Cal vissé	0,0283	—
3	Pseudarthrose	—	0,0215
4	Diaphyse patte arrière ..	0,0045	0,0146
5	Cal spontané	0,0249	0,0298
6	Diaphyse patte avant	0,0051	0,0186

On voit que le taux de la radioactivité des phospholipides est déjà atteint au bout de 12 h. sauf pour les diaphyses de pattes fracturées où l'apparition du phosphore radioactif est plus lente et n'atteint un taux voisin des pattes témoins qu'en 24 heures.

V. Autoradiogrammes

Pratiqués après chromatographie, ils apportent des renseignements identiques, mais avec une meilleure sensibilité.

Il faut noter l'importance de la tache restant au point de départ pour les deux parties de la patte ayant subi un ostéosynthèse.

Il est également intéressant de constater que sur l'autoradiogramme pratiqué 12 heures après l'injection de phosphore radioactif on observe une migration très peu importante de ces deux taches, comme si l'ostéosynthèse déclenchait des modifications de structure des phospholipides se traduisant par un temps de latence avant le début de la migration.

Autoradiogramme.

1 Patte témoin
2 Cal tissé.
3 Diaphyse patte arrière
4 Cal spontané
5 Diaphyse patte avant

C) DISCUSSION DE NOS RESULTATS

La fracture d'un os entraîne une modification notable de ses lipides totaux, de ses phospholipides et de ses stérides.

Ces variations atteignent tout le squelette.

Tels sont les résultats fournis par nos recherches, nous les résumons dans le tableau suivant indiquant des moyennes exprimées en grammes pour 100 grammes d'os frais.

TABLEAU N° XVIII

Valeurs moyennes des lipides osseux avant et après fracture

	Lipides totaux	Phospholipides	Stérides
Rat			
Os normal	1,13	0,14	0,05
Os fracturé	3,38	0,42	0,08
Os témoin	2,58	0,41	0,09
Chien			
Os normal	1,20	0,11	0,02
Os fracturé	4,05	0,35	0,02
Os témoin	2,58	0,22	0,05

Nous appelons os témoin un os non fracturé d'un animal porteur d'une fracture.

Cette élévation générale des lipides après fracture laisse penser que ces composés ont un rôle important dans le métabolisme de l'os et dans sa reconstruction.

Elle méritera d'être comparée à l'accroissement de la teneur en azote des os fracturés, signalée par ROCHE et MOURGUE (182) et due à la déminéralisation temporaire. Mais l'augmentation des phospholipides peut aussi contribuer à cet accroissement du taux de l'azote.

Les variations lipidiques, phospholipidiques et stéridiques se font suivant des sens parfois opposés et avec une importance différente dans les diverses parties de l'os fracturé : cal et diaphyse voisine. Ces variations tiennent à des actions métaboliques certaines, mais encore difficile à préciser.

Connaissant les rôles multiples des phospholipides, nous pouvons penser qu'ils agissent sur la perméabilité cellulaire pour assurer la pénétration dans les ostéoblastes des matériaux nécessaires à l'élaboration du collagène et des mucopolysaccharides. Mais ils peuvent servir aussi à la formation de complexes lipoprotéiques, LEACH (130), ou à des fins énergétiques.

La phase d'enrichissement osseux en phospholipides et en glycérides est temporaire sans doute mais persiste encore chez le rat deux mois après la fracture.

Nos résultats peuvent être rapprochés de ceux que Cartier et ses collaborateurs (40-41) ont obtenus en étudiant la réparation des fractures au moyen du P_{32}. Ils décrivent une première étape de la formation du cal, caractérisée par une fixation lente du P_{32} et consistant dans la transformation du support protéique en matière préosseuse et la phosphorylation de celle-ci.

Les 20 premiers jours de la régénération des fractures du rat au cours desquels les taux de lipides totaux et de phospholipides augmentent peu dans la patte fracturée correspondraient à cette période.

La seconde phase de minéralisation rapide, qui se produit à partir du 15e-20e jour dans les expériences de Cartier, paraît correspondre à l'augmentation notable des lipides totaux et des phospholipides observée le 30e jour de l'évolution des fractures de rats et à la diminution des stérides par rapport aux lipides totaux.

Chez le chien, la relation est plus difficile à établir. Il est vrai que nos expériences n'ont porté que sur des durées assez brèves. Les résultats obtenus pour des os fracturés 15 à 35 jours auparavant ne montrent qu'une partie des variations lipidiques. Il faudrait faire durer plusieurs mois de nouvelles expériences.

L'évolution lipidique des cals et des diaphyses voisines paraît se schématiser comme suit chez le chien :

— Rapide augmentation des lipides totaux et des phospholipides dans la diaphyse de l'os fracturé.

— Cette augmentation gagne le cal avec quelques variations suivant qu'il s'agit d'un cal spontané ou d'un cal d'ostéosynthèse.

— Au bout de 35 jours, les lipides totaux et les phospholipides sont encore élevés mais commencent à s'abaisser dans les diaphyses et dans les cals de fractures traitées par simple immobilisation.

— Un taux élevé peut persister encore dans les diaphyses après ostéosynthèse. Cela montre que le métabolisme lipidique osseux est modifié par la présence des pièces métalliques nécessaires à la réalisation de l'ostéosynthèse.

— La constitution d'une pseudarthrose diminue notablement la présence lipidique et phospholipidique dans la diaphyse au bout de 5 semaines.

— Les variations du cholestérol total sont faibles, de sorte que le rapport des stérides aux lipides totaux est très inférieur à sa valeur dans l'os normal. Nous ne pouvons encore interpréter définitivement nos premiers résultats.

Quoi qu'il en soit, nous savons maintenant avec certitude qu'un métabolisme lipidique accru se situe au niveau de l'os fracturé et de tout le squelette pendant la réparation des fractures.

La recherche des étapes de ce métabolisme sera une phase ultérieure de nos recherches.

Conclusions

— L'os long normal de chien et de rat contient des lipides dans son tissu compact.

— Ces lipides que nous avons identifiés par chromatographie comprennent :

- des Glycérides,
- des Stérides,
- des Phospholipides Lécithines,
  Lysolécithines,
  Céphalines,
  Acides phosphatidiques,
  Inositolphosphatides,
  Sphingomyélines,

et sans doute des Glucolipides.

— Nous avons déterminé pour 100 g d'os non desséché les valeurs moyennes :

des lipides totaux	1,13 g	chez le rat,	1,20 g	chez le chien
des phosphatides	0,14 g	—	0,11 g	—
des stérides	0,05 g	—	0,05 g	—

— L'os fracturé subit au cours de sa réparation, un certain nombre de modifications lipidiques :

Son extrait lipidique total augmente, ainsi que ses phospholipides et ses stérides.

— Une partie de ces modifications atteint tout le squelette et se retrouve dans les os témoins non fracturés.

— L'accroissement des lipides totaux est de l'ordre de :

200 % dans l'os fracturé,

125 % dans l'os symétrique.

Les phospholipides augmentent de 200 et 190 % dans l'os fracturé et dans l'os symétrique.

Les stérides s'élèvent de 60 % dans l'os fracturé et davantage, 150 %, dans l'os témoin.

— Les fractions lipidiques et certains de leurs constituants sont à des taux différents dans les diverses parties de l'os fracturé, cal et diaphyse.

Elles subissent des variations dans le temps avec l'évolution du cal ou avec la formation d'une pseudarthrose.

Ces variations mettent en cause une participation lipidique au processus de réparation.

Dans le tissu osseux, les divers métabolismes :

protéique,
glucidique,
glycoprotéidique,
minéral,
et lipidique,

sont donc intimement liés et dépendant les uns des autres.

Ils ne peuvent être séparés. Chacun d'eux participe à l'équilibre et à la nutrition du tissu osseux ainsi qu'à la réparation post-fracturaire.

Vu : *Le Président de Thèse,*
VIRENQUE

Vu : *Le Doyen,*
LAZORTHES

Vu et permis d'imprimer
Toulouse, le 13 juin 1961
Le Recteur
Président du Conseil de l'Université
DOTTIN

Bibliographie

1. Ada G. L. — Phospholipins metabolism in rabbit liver cytoplasm. *Biochem. J.*, 1949, *45*, 422-428.

2. Albright F. — Cushing's syndrome. Its pathological physiology ; its relationship to the adrenogenital syndrome and its connection with the problem of the reaction of the body to injurious agents (« Alarm reaction » of Selye). *Harvey Lect.*, 1943, *38*, 123-186.

3. Albright F. et Ellsworth R. — Studies on physiology of parathyroid glands ; calcium and phosphorus studies on case of idiopathic hypoparathyroidism. *J. Clin. Invest.*, 1929, *7*, 183-201.

4. Albright F. et Reifenstein E. C. Jr. — *The parathyroid glands and metabolic bone disease.* Williams et Wilkins, Baltimore, 1948.

5. Altman K. I., Richmond J. E. et Salomon K. — A note on the synthesis of fatty acids in bone marrow homogenates as affected by X-radiation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1951, *7*, 460-465.

6. Annersten S. — Experimentelle Untersuchungen über die Osteogenese und die Biochemie des Frakturcallus. *Acta chir. Scand.*, 1940, *84*, Suppl. 60, 1-181.

7. Aron H. v. et Gralka R. — Stützgewebe und Integumente der Wirbeltiere, in Oppenheimer, *Handbuch der Biochemie*, G. Fischer, Iena, 1925, *4*, 222-234.

8. Askanazy M. — Ueber osteitis deformans ohne osteoides Gewebe. Baumgarten's Arbeiten aus dem Geb. d. path. *Anat. Inst. Tübingen*, Leipzig, 1904, *4*, 398-412.

9. Baïsset A., Chancholle-Giorgetti N., Montastruc P., Planel H. et Valdiguié P. — Contribution à l'étude expérimentale de l'action des vitamines sur l'ossification. *Gaz. Hôp.*, 1957, *129*, 607-616.

10. Baïsset A., Douste-Blazy L., Montastruc P., Planel H. et Virenque J. — Contribution à l'étude expérimentale de l'action des hormones sur la croissance des os longs. *Sem. Hôp.*, 1953, *29*, 63-69.

11. Baïsset A., Douste-Blazy L., Montastruc P., Planel H. et Virenque J. — Azione degli ormoni sulla crescita delle ossa lunghe. *Omnia Med.*, 1953, *5*, 6-13.

12. Baïsset A., Douste-Blazy L., Montastruc P., Planel H. — Contribution à l'étude expérimentale de l'action de la thyroxine et des œstrogènes sur l'ossification. *J. Physiol.*, 1954, *46*, 731-744.

13. Baker S. L., Butterworth E. C. et Langley F. A. — Calcium and nitrogen content of human bone cleaned by microdissection. *Biochem. J.*, 1946, *40*, 391-396.

14. Barnicot N. A. — Local action of vitamin A on bone. *J. Anat.*, 1950, *84*, 374-387.

15. Bastiani G. de, Fonzone B., Lunardo C. — Importanza del metabolismo lipidico sull'acrescimento scheletrico del ratto. *Chir. Org. Mov.*, 1958, *45*, 109-115.

16. Bavetta L. A. et Bernicks S. — Lysine deficiency and dental structure. *J. Am. Dental Assoc.*, 1955, *50*, 427-433.

17. Bear R. S. — Long X-ray diffraction spacings of collagen. *J. Am. Chem. Soc.*, 1942, *64*, 727.

18. Bear R. S. — The structure of collagen. *Advances in Protein Chem.*, 1952, *7*, 69-160.

19. Belanger L. F. — Autoradiographic vizualisation of the entry and transit of S^{35} in cartilage, bone and dentine of young rats and the effect of hyaluronidase in vitro. *Canad. J. Biochem. and Physiol.*, 1954, *32*, 161-169.

20. Bernhard K. et Korrodi H. — Ueber menschliches Knochenmark und Depotfett. *Helv. Chim. Acta*, 1947, *30*, 1786-1797.

21. Bertelsen A. — Experimental investigations in vitro into postfœtal osteogenesis. *Acta Orthop. Scand.*, 1944, *15*, 139-181.

22. Bevelander G. et Johnson P. L. — A histochemical study of the development of membrane of bone. *Anat. Record*, 1950, *108*, 1-22.

23. Boedtker H. et Doty P. — The native and denatured states of soluble collagen. *J. Am. Chem. Soc.*, 1956, *78*, 4267-4280.

24. Bohr H. — Studies on fracture healing. *J. Bone and Joint Surg.*, 1955, *37 A*, 327-337.

25. Bolle A. — Ueber den Lecithingehalt des Knochenmarkes von Mensch und Haustieren. *Biochem. Z.*, 1910, *24*, 179-190.

26. Borghese E. — I lipidi nel processo di ossificazione. *Z. Zellfors. mikroskop. Anat.*, 1936, *25*, 622-654.

27. Bornes J. H. et Kenten R. H. — The amino-acids composition and titration curve of collagen. *Biochem. J.*, 1948, *43*, 358-365.

28. Boulanger P. et Polonovski J. — *Traité de Biochimie générale*, Tome I, Masson et Cie, Paris, 1959.

29. Bourde Y. — Le traitement des retards de consolidation par l'hormonothérapie intrafocale. *Marseille Méd.*, 1941, *78*, 436-442.

30. Boyd E. S. et Neuman W. F. — The surface chemistry of bone. V. The ion-binding properties of cartilage. *J. biol. Chem.*, 1951, *193*, 243-251.

31. Bourne G. — Distribution of alcaline phosphatase in various tissues. *Quart. J. Exptl. Physiol.*, 1943, *32*, 1-19.

32. Bradfield J. R. — Phosphatase cytochemistry in relation to protein secretion. *Exptl. Cell. Research*, 1949, *Suppl. 1*, 338-350.

33. Brux J. de. — Constitution histochimique de la substance fondamentale et maladies dites « du collagène ». *Pr. Méd.*, 1951, *59*, 627-630.

34. Buerger L. et Gies W. J. — The chemical constituants of tendinous tissue. *Am. J. Physiol.*, 1901, *6*, 219-230.

35. Cartier P. — Contribution à l'étude biochimique de l'ossification. *Thèse Méd.*, Paris, 1946, n° 242.

36. Cartier P. — Etude des protéases de l'os. II Les Peptidases. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1946, *28*, 259-273.

37. Cartier P. — Etat actuel du problème biochimique de l'ossification. *Rev. Chir. Orthop.*, 1947, *33*, 261-272.

38. Cartier P. — Les constituants minéraux du tissu calcifié. I. La structure minérale de l'os, de la dentine et du cément. II. La structure moléculaire du sel de l'os. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1948, *30*, 65-81.

39. Cartier P. — In M. Polonovski, *Pathologie chimique*, Masson, Paris, 1952.

40. Cartier P., de Bernard B. et Lagrange J. — Studies on the repair of fractures usin P^{32}. Ciba Foundation Symposium, *Bone structure and metabolism*, London, 1956.

41. Cartier P., de Bernard P. et Lagrange J. — La réparation des fractures. I. Evolution biochimique du cal et réaction du squelette. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1960, *42*, 427-444.

42. Cartier P., Picard J., de Bernard B. et Lagrange J. — La réparation des fractures. II. Le bilan phosphocalcique au cours de la réparation. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1960, *42*, 445-456.

43. Casuccio C. — Avitaminosis and osteopathy. Vitamin E deficiency. Fifth Congress of International Society of Orthopaedic and Traumatic Surgery. *J. Bone and Joint Surg.*, 1951, *33 A*, 1035.

44. Cheng L. T. — Die Lipoide des Knochenmarkes. *Z. Physiol. Chem.*, 1931, *201*, 209-218.

45. Claassen V., Vogels R. J. et Wostmann B. — Independant synthesis of phospholipids in femur and tibia of white rats. *Nature*, 1952, *169*, 191-192.

46. Collip J. B. — The internal secretion of the parathyroïd glands. *Proc. Nat. Acad. Sc. N.-Y.*, 1925, *11*, 484-485.

47. Coryn G. — Les affections endocriniennes du squelette. *Pr. Méd.*, 1937, *45*, 1582-1585, 1649-1651, 1873-1876. - 1938, *46*, 228-231.

48. Courtois J. E. et Perlés R. — *Précis de Chimie biologique*, Masson, Paris, 1959.

49. Crick F. H. C. et Rich A. — Structure of Polyglycine II. *Nature*, 1955, *176*, 780-781.

50. Dallemagne M. J. — La biochimie de l'ossification. *J. Radiol. Electroradiol.*, 1951, *32*, 176-188.

51. Delsal J. L. et Manhouri H. — Etude comparative des dosages colorimétriques du phosphore. Recherche d'une méthode de haute sensibilité applicable au dosage du phosphore organique dans les spots après chromatographie. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1955, *37*, 1041-1054.

52. Deuel H. J. — *The lipids*, Intersciences Publications, New-York, 1951.

53. Dickens F. — The citric acid content of animal tissue with reference to its occurence in bone and tumor. *Biochem. J.*, 1941, *35*, 1011-1023.

54. Dietz A. A. — Composition of normal bone marrow in rabbits. *J. biol. Chem.*, 1946, *165*, 505-511.

55. Dietz A. A. — Chemical composition of normal bone marrow. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1949, *23*, 211-221.

56. Douste-Blazy L. — Contribution à l'étude analytique des phospholipides du plasma. *Thèse de Sciences*, Toulouse, 1955.

57. Douste-Blazy L., Polonovski J. et Valdiguié P. — Chromatographie sur papier des phospholipides. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1956, *38*, 19-26.

58. Douste-Blazy L., Polonovski J. et Valdiguié P. — Fractionnement chromatographique des lipides sanguins. Etude des phosphatides. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1956, *38*, 27-33.

59. Dubreuil G. — Vacuoles à lipoïdes des ostéoblastes, des cellules osseuses et des ostéoclastes. *C. R. Soc. Biol.*, 1910, *69*, 189-190.

60. Dulce H. J. — Zur Biochemie der Verknœcherung. I. Mineralgehalt und Grundsubstanz Zusammensetzung des hyalinen Knorpels, des Verknœcherden Knorpel und des Knochen. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 1960, *319*, 257-271.

61. Dulce H. J. — Zur Biochemie der Verknœcherung. II. Enzymaktivitæten im hyalinen Knorpel, in Verknœcherden Knorpel und im Knochen. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 1960, *319*, 271-289.

62. Dulce H. J. — Zur Biochemie der Verknœcherung. III. Mineralgehat, Grundsubstanz Zusammensetzung und Enzymaktivitæten im Callusgewebe und in rachitischen Knochen von Ratten. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 1960, *320*, 1-10.

63. Duthie R. B. et Barker A. N. — An autoradiographic study of polymucosaccharide and phosphate complexes in bone growth and repair. *J. Bone and Joint Surg.*, 1955, *37 B*, 304-323.

64. Dziewiatkowski D. D. — Some aspects of the metabolism of chondroitin sulfate S^{35} in the rat. *J. biol. Chem.*, 1956, *223*, 239-249.

65. Eastoe J. E. — The amino-acid composition of mammalian collagen and gelatin. *Biochem. J.*, 1955, *61*, 589-600.

66. Eastoe J. E. et Eastoe B. — The organic constituents of mammalian compact bone. *Biochem. J.*, 1954, *57*, 453-459.

67. Engfeldt B. — Recent observations on bone structure. *J. Bone and Joint Surg.*, 1958, *40 A*, 698-706.

68. Engstrœm A. — Structure of bone from the anatomical to the molecular level. Ciba Foundation Symposium, « *Bone structure and metabolism* », London, 1956.

69. Erdheim J. — Ueber Epithel Korperbefunde bei Osteomalacie. *Sitzungsber. d. Akad. d. Wiss. Wien*, 1907, *116*, 311-370.

70. Euler B. v., Euler H. v. et Hellstrom H. — A-Vitaminwirkungen der Lipochrome. *Biochem. Z.*, 1929, *203*, 370-384.

71. Fell H. B. et Robison R. — The growth, development and phosphatase activity of embryonic avian femora and limb-buds cultivated in vitro. *Biochem. J.*, 1929, *23*, 767-784.

72. Folch J., Ascoli I., Less M., Meath J. A. et Le Baron F. N. — Preparation of lipide extracts from brain tissue. *J. biol. Chem.*, 1951, *191*, 833-841.

73. Folch J. et Lees M. — Proteolipids, a new type of tissue lipoproteins. Their isolation from brain. *J. biol. Chem.*, 1951, *191*, 807-817.

74. Follis R. H. Jr. — Histochemical studies on cartilage and bone. II. Ascorbic acid deficiency. *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 1951, *89*, 9-20.

75. Follis R. H. Jr. et Berthrong M. — Histochemical studies on cartilage and bone. I. The normal pattern. *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 1949, *85*, 281-296.

76. Follis R. H. Jr., Bush J. A., Cartwright G. E. et Wintrobe M. M. — Studies on copper metabolism ; skeletal changes associated with copper deficiency in swine. *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 1955, *97*, 405-413.

77. Fontaine R., Chevallier A., Mandel P. et Wiest E. — Etude expérimentale, histologique et biochimique de la réparation des fractures chez le chien. *Lyon Chir.*, 1950, *45*, 145-160.

78. Fourman P. — *Calcium metabolism and the bone*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1960.

79. Gabriel S. — Chemische Untersuchungen über die Mineralstoffe der Knochen und Zæhne. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 1894, *18*, 257-303.

80. Gardner W. U. et Pfeiffer C. A. — Skeletal changes in mice receiving estrogens. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1938, *37*, 678-679.

81. Gersh I. et Catchpole H. R. — The organizacion of ground substance and basement membrane and its signifiance in tissue injury, disease and growth. *Am. J. Anat.*, 1949, *85*, 457-522.

82. Giangrasso G. — Vitamina C e guarigione delle fratture. *Fisiol. e Med.*, 1938, *9*, 255-296.

83. Giangrasso G. — Fratture sperimentali e vitamine C e D. *Boll. Soc. It. Biol. Sper.*, 1939, *14*, 522-524.

84. Glikin W. — Ueber den Lecithingehalt des Knochenmarkes beim Tieren und beim Menschen. *Biochem. Z.*, 1907, *18*, 235-251.

85. Glock G. E. — Glycogen and calcification. *J. Physiol.*, 1940, *98*, 1-11.

86. Gomori G. — The distribution of phosphatase in normal organs and tissues. *J. Cellular Comp. Physiol.*, 1941, *17*, 71-83.

87. Gorup-Besanez E. de. — *Traité d'analyse zoochimique qualitative et quantitative.* Reinwald et Cie, Paris, 1875.

88. Greep R. O., Fischer C. J. et Morse A. — Alkaline phosphatase in odontogenesis and its histochemical demonstration after demineralization. *J. Am. Dental Assoc.*, 1948, *36*, 427-442.

89. Gross J. — The behavior of collagen units as a model in morphogenesis. *J. Biophys. Biochem. Cytol. Suppl.*, 1956, *2*, 261-274.

90. Gross J., Highberger J. H. et Schmitt F. O. — Collagen structures considered as states of aggregation of a kinetic unit, topocollagen particle. *Proc. Nat. Acad. Sc. U. S.*, 1954, *40*, 679-688.

91. Gross J., Highberger J. H. et Schmitt F. O. — Extraction of collagen from connective tissue of neutral salt solutions. *Proc. Nat. Acad. Sc. U.S.*, 1955, *41*, 1-7.

92. Guldager A. — Hypervitaminosis D. Belyst gennen Kvantitative Overdoserings forsog (Doktor Disp.), *Nyt Nordisk Forlag*, Copenhague, 1936.

93. Gutman A. B. et Gutman E. B. — A phosphorilase in calcifying cartilage. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1941, *48*, 687-691.

94. Hall C. E. — Method for the observations of macromolecules with the electron microscope. *J. Biophys. Biochem. Cytol*, 1956, *2*, 625-628.

95. Ham A. W. — A histological study of the early phases of bone repair. *J. Bone and Joint Surg.*, 1930, *12*, 827-841.

96. Hamilton P. B. — Studies of the nature of the protein components of bones. Trans 4th *Josiah Macy Jr. Found. Conf.*, 1952, 59-60.

97. Hammet F. S. — A biochemical study of bone growth. III. Changes in the composition of the ash during growth. *J. biol. Chem.*, 1925, *64*, 693-696.

98. Harris H. A., Neuberger A. et Sanger F. — Lysine deficiency in young rats. *Biochem. J.*, 1943, *37*, 508-513.

99. Harrison H. E. et Harrison H. C. — The renal excretion of inorganic phosphate in relation to the action of vitamin D and parathyroid hormone. *J. Clin. Invest.*, 1941, *20*, 47-55.

100. Hartley J., Tanz S. S. et Schneider M. — Osteogenesis produced by a chemical extract of bone. *J. Mount Sinaï Hosp.*, 1949, *15*, 383-387.

101. Hawk P. B. et Gies W. J. — Chemical studies of osseomucoid with determinations of the heat of combustion of some connective tissue glucoproteids. *Am. J. Physiol.*, 1901, *5*, 387-425.

102. Heinen J. H., Dabbs G. H. et Mason H. A. — The experimental production of ectopic cartilage and bone in the muscles of rabbits. *J. Bone and Joint Surg.*, 1949, *31 A*, 765-775.

103. Heller-Steinberg M. — Ground substance, bone salts and cellular activity in bone formation and destruction. *Am. J. Anat.*, 1951, *89*, 347-380.

104. Hilditch T. P. et Murti K. S. — The component acids of an ox bone marrow fat. *Biochem. J.*, 1940, *34*, 1299-1300.

105. Hill J. C. — Cytology and histochemistry of osteoblasts grown in vitro. *Arch. f. Exptl. Zellsforsch.*, 1936, *18*, 496-511.

106. Holmberg J. et Rosenqvist U. — Bone fats from ox. *Svensk Kem. Tidskd.* 1951, *63*, 12-25.

107. Hotchkiss R. D. — A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structures in fixed tissue preparation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1948, *16*, 131-141.

108. Hutchinson R. et Mac Leod J. J. R. — A contribution to our knowledge of the chemistry of red bone marrow. *J. Anat. Physiol.*, 1902, *36*, 292-295.

109. Hutton W. E. et Nuckolls J. — Frequency of nihydrin staining in the enamel surfaces of completely unerupted, undecalcified human third molars in relation to the problem of caries susceptibility. *Oral Surg., Oral Med., Oral Path.*, 1951, *4*, 1451-1456.

110. Imperati L. — L'influenza dell'acido ascorbico sulla evoluzione del callo nelle fratture sperimentali. *Arch. It. Med. Sper.*, 1938, *2*, 655-672.

111. Jackson S. Fitton et Smith R. H. — Biosynthesis of collagen. I. Growth of fowl osteoblast and the formation of collagen in tissue culture. II. Conversion of L-Proline-C_{14} to hydroxyproline-C_{14} by fowl osteoblast in tissue culture. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1957, *3*, 897-922.

112. Jaffe H. L. et Bodansky A. — Experimental fibrous osteodystrophy in hyperparathyroids dogs. *J. Exp. Med.*, 1930, *52*, 669-694.

113. James A. T. — Communication orale.

114. Jarrier M. et Polonovski J. — Méthode de dosage des acides gras estérifiés et son application au sérum sanguin. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1955, *37*, 495-499.

115. Judet R., Judet J., Lagrange J., Cartier P. et Dunoyer J. — Fractures expérimentales. Etude préliminaire au moyen du radiophosphore. *Mém. Acad. Chir.*, 1955, *81*, 733-737.

116. Kersten H., Kersten W. et Staudinger H. — Zum Wirkungsmechanisms der Ascorbinsæure. I. Isolierung einer Ascorbinsæureabhængigen DPNH-Oxydase aus Nebennierenmikrosomen. *Biochim. Biophys. Acta*, 1958, *27*, 598-608.

117. King E. I. — The enzymic hydrolysis of lecithin. *Biochem. J.*, 1931, *25*, 799-811.

118. Kodicek E. — Metabolic studies on vitamin D. Ciba Foundation Symposium, « *Bone structure and metabolism* », London, 1956.

119. Korff K. v. — Die Entwicklung der Zæhnebeingrundsubstanz der Saügetiere. *Arch. Mikroskop. Anat. Entwicklungs Mech.*, 1906, *67*, 1-17.

120. Krause R. F. — Changes induced by anemia in the bone marrow lipids of cats. *J. biol. Chem.*, 1943, *199*, 395-404.

121. Krebs H. A. — The physiological role of the ketone bodies. *Biochem. J.*, 1961, *80*, 225-233.

122. Kretchmer N. et Barnum C. P. — Partition of cytoplasmic lipides. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1951, *31*, 141-147.

123. Krisch K. et Staudinger H. — Zur Wirkung von Ascorbinsæure und Cytochrom b 5 auf die mikrosomale DPNH-Oxydation. *Biochem. Z.*, 1959, *331*, 195-208.

124. Laborit H. — Utilisation d'un extrait somatotrope hypophysaire en pathologie générale et dans les techniques d'hibernothérapie. *Thérapie*, 1953, *8*, 827-845.

125. Lacroix P. — Recent investigations on the growth of bone. *Nature*, 1945, *156*, 576.

126. Lacroix P. — Radiocalcium and radiosulfure in the study of bone metabolism at the histological level. *Proceedings of the Second Radioisotope Conference, Oxford*, 19-23 rd July 1954, Buttersworths Scientific Publication, London.

127. Landsteiner K. et Ehrlich H. — Ueber bakterizide Wirkungen von Lipoïden und ihre Beziehung zur Komplement-wirkung. *Centralbl. f. Bakteriol.*, 1907, *45*, 247-257.

128. Laurence G. — Biologie de la consolidation osseuse. *Rev. Praticien*, 1959, *9*, 1831-1834.

129. Lea G. H. et Rhodes D. N. — Partition chromatography of egg-yolk phospholipidins on cellulose. *Biochem. J.*, 1953, *54*, 467-469.

130. Leach A. A. — The lipids of ox compact bone. *Biochem. J.*, 1958, *69*, 429-432.

131. Leriche R. — *Physiologie et Pathologie du tissu osseux*, Masson, Paris, 1939.

132. Leriche R. et Jung A. — Qu'est-ce qu'un cal ? - Signification du mot. Problèmes d'origine. Maladie biologique des fractures. *J. Chir.*, 1940, *55*, 193-204.

133. Leriche R. et Policard A. — *Les problèmes de la physiologie normale et pathologique de l'os*, Masson, Paris, 1926.

134. Levander G. — A study of bone regeneration. *Surg. Gyn. Obst.*, 1938, *67*, 705-714.

135. Levander G. — An experimental study of the role of the bone marrow in bone regeneration. *Acta Chir. Scand.*, 1940, *83*, 545-560.

136. Levander G. et Willestaedt H. — Alcohol soluble osteogenetic substance from bone marrow. *Nature*, 1946, *157*, 587.

137. Levine M. D., Rubin P. S., Follis R. H. Jr. et Howard J. E. — Histochemical studies on calcinosis universalis with respect to the possible relationship between normal and pathological calcification. Metabolic Interrelations, *Josiah Macy Jr. Foundation*, New-York, 1949, 41-48.

138. Lichwitz A., Thiery G., Parlier R. et Delaville M. — Les hormones génitales et le cartilage de conjugaison. *Sem. Hôp.*, 1951, *6*, 247-250.

— Histophysiologie de la croissance. *Sem. Hôp.*, 1951, *6*, 225-269.

139. Liebermann C. — Ueber das Oxychinoterpen. *Berichte*, 1885, *18*, 1803-1809.

140. Lightfoot L. H. et Coolidge T. B. — The distribution of collagen in the guinea pig. *J. biol. Chem.*, 1948, *176*, 477-484.

141. Lorch J. J. — Demonstration of phosphatases in decalcified bone. *Nature*, 1946, *158*, 269.

142. Mæjno G. et Rouiller C. — Die alkalische Phosphatase in der Biologie des Knochengewebes. *Virchow's Arch. Path. Anat. u. Physiol.*, 1951, *321*, 1-61.

143. Marinetti G. V. et Stotz E. — Chromatography of phosphatides on silicic acid impregnated paper. *Biochim. Biophys. Acta*, 1956, *21*, 168-170.

144. Mellamby E. — *A story of nutritional research*. Williams and Wilkins, Baltimore, 1950.

145. Mignogna A., Boccia L. et Savoia A. — L'histochimica dei lipidi nella riparazione delle fratture. *Arch. Ortoped.*, 1956, *69*, 19-24.

146. Mitoma C. et Smith T. E. — Role of ascorbic acid in collagen synthesis. *J. biol. Chem.*, 1960, *235*, 426-428.

147. Morgulis S. et Janecek E. — Studies on the chemical composition of bone ash. *J. biol. Chem.*, 1931, 93, 455-466.

148. Munson P. L. — Studies on the role of the parathyroids in calcium and phosphorus metabolism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1955, *60*, 776-796.

149. Nachlas M. M., Tsou K. C., de Souza E., Cheng C. S. et Seligman A. M. — Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substitued ditetrazoli. *J. Histochem. Cytochem.*, 1957, *5*, 420-436.

150. Nerking J. — Beitræge zur Kenntnis des Knochenmarkes. *Biochem. Z.*, 1908, *10*, 167-191.

151. Newlin H. E. et Mac Cay C. M. — Bone marrow for fat storage in rabbits. *Arch. Biochem.*, 1948, *17*, 125-128.

152. Nicolaysen R. et Egg-Larsen N. — The biochemistry and physiology of vitamin D. In R. S. Harris, G. F. Marrian and K. V. Thimann, *Vitamins and Hormones*. Academic Press, New-York, 1953, T. *11*.

153. Nicolaysen R. et Jansen J. — Vitamin D and bone formation in rats. *Acta Paediat.*, 1939, *23*, 405-433.

154. Nicolosi G. et Petrina N. — Reperti histochimici lipodei nel callo osseo sperimentale. *Arch. It. Med. Sper.*, 1947, *19*, 265-277.

155. Ollier L. — *Traité expérimental et clinique de la régénération des os et de la production artifcielle du tissu osseux*, Masson, Paris, 1867.

156. Osborne T. B. et Mendel L. B. — Amino-acids in nutrition and growth. *J. biol. Chem.*, 1914, *17*, 325-349.

157. Otolski S. W. — Das Lecithin des Knochenmarkes. *Biochem. Z.*, 1907, *4*, 124-145.

158. Petersen H. — *Die Organe des Skeletsystems.* Mœllendorff's Handb. mikroskop. Anat. Mensch, Julious Springer, Berlin, 1930.

159. Pfeiffer C. — Development of bone from tlansplanted marrow in mice. *Anat. Record*, 1948, *102*, 225-243.

160. Picard J. et Cartier P. — La minéralisation du cartilage ossifiable. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1960, *42*, 1105-1123.

161. Pikulev A. T. — Osseocollagen. A cholesterol-protein complex. *Ukraïn. Biokim. Zhur.*, 1955, *27*, 517-521.

162. Pincus P. — Dental physiology. Vitality of teeth ; respiration. *Australian J. Dentistry*, 1953, *57*, 7-9.

163. Policard A. et Roche J. — La formation de la substance osseuse, essai de coordination des données histologiques et biologiques. *Ann. Physiol. Physicochimie Biol.*, 1937, *13*, 645-712.

164. Polonovski J., Etienne J., Paysant J. et Petit M. — Fractionnement chromatographique des phospholipides plasmatiques. *Ann. Biol. Clin.*, 1959, *17*, 186-192.

165. Polonovski M., Boulanger P., Machebœuf M. et Roche J. — *Biochimie Médicale* (6e édition), Masson, Paris, 1961.

166. Polonovski M. et Cartier P. — Etude des protéines de l'os. I. Les protéinases. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1946, *28*, 247-258.

167. Pritchard J. J. — The osteoblast, in G. H. Bourne. *The biochemistry and physiology of bone.* Academic Press, New-York, 1956.

168. Pritchard J. J. et Ruzicka A. J. — Comparison of fracture repair in frog, lizard and rat. *J. Anat.*, 1950, *84*, 236-261.

169. Ramalingaswami V., Spiramachari S., Dikshit P. K., Tulpule P. G. et Patwardhan V. N. — Mode of action of vitamin D ; histochemical study of rachitic epiphyseal cartilage during healing in albino rat. *Indian J. Med. Sci.*, 1954, *8*, 509-516.

170. Reed C. I. et Reed B. P. — An attempted correlation of mechanical properties of bone with molecular structures as determined by X-ray diffraction technique. *Am. J. Physiol.*, 1942, *138*, 34-41.

171. Reifenstein E. C. Jr et Albright F. — The metabolic effects of steroid hormones in osteoporosis. *J. Clin. Invest.*, 1947, *26*, 24-56.

172. Riddle O. et Reinhart W. H. — Studies on the physiology of reproduction in birds. XXI. Blood calcium changes in the reproductive cycle. *Am. J. Physiol.*, 1926, *76*, 660-676.

173. Robertson W. van B., Hiwett J. et Herman C. — The relation of ascorbic acid to the conversion of proline to hydroxyproline in the synthesis of collagen in the carrageenan granuloma. *J. biol. Chem.*, 1959, *234*, 105-108.

174. Robinson R. A. — Chemical analysis and electron microscopy on bone. In *Bone as a tissue*. K. Rodahl, J. T. Nicholson and E. M. Brown Jr. - Mac Graw-Hill Book Co. New-York, 1960.

175. Robinson R. A. et Watson M. L. — Collagen crystal relationship in bone as seen in the electron microscope. *Anat. Rec.*, 1952, *114*, 383-409.

176. Robison R. — The possible significance of hexose phosphoric esters in ossification. *Biochem. J.*, 1923, *17*, 286-293.

177. Roche A. et Garcia I. — Recherches sur l'ossification. I. Ossification normale et constitution de réserves minérales dans les os au cours du développement. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1936, *18*, 1014-1026.

178. Roche A., Roche J. et Marcellet Y. — Recherches sur l'ossification. IV. Ossification des os plats, étapes du développement du squelette et biochimie générale du système osseux. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1938, *20*, 705-719.

179. Roche J. — Recherches biochimiques sur les réactions générales du squelette après fracture d'un os et unité physiologique du système osseux. *J. Chir.*, 1939, *53*, 737-745.

180. Roche J. et Martin-Poggi R. — Recherches sur l'ossification. Rôle de la vitamine C et de la phosphatase dans la formation de la substance osseuse, en particulier dans les cals de fracture. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1941, *23*, 1535-1545.

181. Roche J. et Mourgue M. — Le système osseux. Unité physiologique. Modifications générales de la composition du squelette après fracture d'un os long. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, *129*, 978-981.

182. Roche J. et Mourgue M. — Recherches sur l'ossification. VI. Modifications générales de la composition des os longs après fracture expérimentale d'une pièce squelettique et unité physiologique du système osseux. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1939, *21*, 142-165.

193. Roche J. et Mourgue M. — Recherches sur l'ossification. VIII. Teneur en phosphore et en calcium des cals de fractures et biochimie des réparations osseuses. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1941, *23*, 1149-1155.

184. Roche J. et Mourgue M. — Recherches sur la biologie des réparations osseuses après fracture expérimentale. *Marseille Méd.*, 1941, *78*, 428-435.

185. Rogers H. J. — Concentration and distribution of polysaccharides in human cortical bone and the dentine of teeth. *Nature*, 1949, *164*, 625-626.

186. Rogers H. J. — The polysaccharides associated with the organic matrix of bone. *Biochem. J.*, 1951, *49*, XII-XIII.

187. Rogers H. J., Weidman S. M. et Parkinson A. — Studies on the skeletal tissues. II. The collagen content of bones from rabbits, oxen, and humans. *Biochem. J.*, 1952, *50*, 537-542.

188. Rohdenburg E. L. — Fat deposition in rat tibia due to lysine deficiency. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1958, *98*, 835-836.

189. Rouiller G. — Collagen fibres of connective tissue. In *The biochemistry and physiology of bone*. G. H. Bourne. Académic Press, New-York, 1956.

190. Schajowicz J. et Cabrini R. — Histochemical study on glycogen in normal ossification and calcification. *J. Bone and Joint Surg.*, 1958, *40 A*, 1081-1092.

191. Schmitt F. O. — The macromolecular basis of collagen structure. In Page S. H. *Connective tissue, thrombosis and atherosclerosis*. Academic Press. New-York, 1959.

192. Schmitt F. O., Hall C. E. et Jakus M. A. — Investigation of collagen by electron microscope. *J. Cellular comp. Physiol.*, 1942, *20*, 11-33.

193. Schreiber B. — Nuove osservazioni su alcuni constituenti chimici degli estratti alcolici ad azione osteoinducente. *Boll. Soc. It. Biol. Sper.*, 1952, *28*, 585-588.

194. Shepanek L. A. — Effect of endocrine substances (ACTH and growth hormone) on experimental fractures. *Surg. Gyn. Obst.*, 1953, *96*, 200-204.

195. Shute W. E. — In *The lipids* H. J. Deuele. Intersciences Publications, New-York, 1951.

196. Siffert R. — The role ol alkaline phosphatase in osteogenesis. *J. Exp. Med.*, 1951, *93*, 415-426.

197. Simonov V. V. et Korendiasev M. A. — Stimulation of regeneration. *Vestnik Khirurgii Imeni I.I. Grekova*, 1958, *82*, 146-154.

198. Simpson M. E., Arling C. W. et Evans H. M. — Some endocrine influences on skeletal growth and differentiation. *Yale J. Biol. Med.*, 1950, *23*, 1-27.

199. Sobel A. E. — Local factors in the mechanism of calcification. *Ann. N.-Y. Acad. Sci.*, 1955, *60*, 713-731.

200. Sognnaes R. F. — Microstructure and histochemical characteristics of the mineralized tissues. *Ann. N.-Y. Acad. Sci.*, 1955, *60*, 541-574.

201. Spector W. S. — *Handbook of biological data*. W. B. Saunders Co. Philadelphie, 1956.

202. Stetten M. R. — Some aspects of metabolism of hydroxyproline studied with acid isotopic nitrogen. *J. biol. Chem.*, 1949, *181*, 31-37.

203. Stewart G. S. et Bowen H. F. — Parathyroid control of serum calcium independent of renal mediation. *Endocrinology*, 1951, *48*, 568-575.

204. Strates B. et Neuman W. F. — On the mechanisms of calcification. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1958, *97*, 688-691.

205. Thomas W. C. Jr. — Comparative studies on bone matrix and osteoid by histochemical techniques. *J. Bone and Joint Surg.*, 1961, *43 A*, 419-427.

206. Thomson D. L. et Collip J. B. — The parathyroid glands. *Physiol. Rev.*, 1932, *12*, 309-383.

207. Trueta J. — Vascularisation des os et de l'ostéogénèse. *Rev. Chir. Orthop.*, 1958, *44*, 3-23.

208. Ulrich F., Reinhardt W. O. et Li C. H. — Effects of hypophyseal growth hormone on metabolism of Ca_{45} in hypophysectomised rats. *Endocrinology*, 1951, *49*, 213-217.

209. Urist M. R. et Mac Lean F. L. — Osteogenic potency and new bone formation by induction in transplants into the anterior chamber of the eye. *J. Bone and Joint Surg.*, 1952, *34 A*, 443-476.

210. Vandergrift G. W. et Gies W. J. — The composition of yellow fibrous connective tissue. *Am. J. Physiol.*, 1901, *5*, 287-297.

211. Watson M. L. et Robinson R. A. — Collagen-crystal relationships in bone as seen in the electron miscroscope. II. Electron microscope study of basic calcium phosphate crystal. *Am. J. Anat.*, 1953, *93*, 25-60.

212. Watson-Jones R. — *Fractures et lésions articulaires traumatiques.* Adaptation française par J. Roussel. Delachaux et Niestle, Paris-Neuchâtel, 1957.

213. Weidman S. M. et Rogers H. J. — Studies on skeletal tissues. I. Degree of calcification of selected mammalian bones. *Biochem. J.*, 1950, *47*, 493-497.

214. Weinmann J. et Sicher H. — *Bone and bones.* Second edition C. V. Mosby et Co, St-Louis, 1955.

215. Wells N. G. — *Chemical pathology.* Second edition. Saunders, Philadelphie, 1914.

216. Wilkins L. — Disturbance in growth. *Bull. N.-Y. Acad. Med.*, 1953, *29*, 280-294.

217. Wilkins L. — Hormonal influence on skeletal growth. *Ann. N.-Y. Acad. Sci.*, 1955, *60*, 763-775.

218. Willestaedt H., Levander G. et Hult L. — Studies on osteogenesis. *Acta Orthop. Scand.*, 1950, *19*, 419-430.

219. Wislocki G. G., Bunting H. et Dempsey E. W. — Metachromasia in mammalian tissues and its relationships to mucopolysaccharides. *Am. J. Anat.*, 1947, *81*, 1-37.

220. Wolbach S. B. — Vitamin A deficiency and excess in relation to skeletal growth. *J. Bone and Joint Surg.*, 1947, *29*, 171-192.

221. Wolbach S. B. — Effects of vitamin A deficiency and hypervitaminosis A in animals. In *The Vitamins*, vol. I. W. H. Sebrell Jr. and R. S. Harris. Academic Press, New-York, 1954.

222. Wolbach S. B. et Bessey O. A. — Vitamin A deficiency and the nervous system. *Arch. Path.*, 1941, *32*, 689-722.

223. Wolbach S. B. et Hegstedt D. M. — Perosis ; epiphyseal cartilage in choline and manganese deficience in chick. *Arch. Path.*, 1953, *56*, 437-453.

224. Wolpers C. — Kollagen querstreifung und Grundsubstanz. *Klin. Woch.*, 1943, *22*, 624.

225. Zetterstrœm R. — Phosphorylation of vitamin D_2, and the action of the phosphorylated compound on alkaline kidney phosphatase. *Nature*, 1951, *167*, 409-410.